

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

TAMIRIS CHAVES FREIRE

**EXTRATO VEGETAL DE *PIPER* COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***

ROLIM DE MOURA
2015

TAMIRIS CHAVES FREIRE

**EXTRATO VEGETAL DE *PIPER* COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra, Sob a orientação do Dr. Cléberson de Freitas Fernandes.

ROLIM DE MOURA
2015

Ficha catalográfica elaborada por
Fernando Silva de Almeida CRB 11/965

F866e Freire, Tamiris Chaves-

Extrato vegetal de *Piper* com potencial atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. / Tamiris Chaves Freire; orientação Cléber de Freitas Fernandes; co-orientação José Roberto Vieira Júnior. – 2016.

62f. ; il.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade Federal de Rondônia. Campus de Rolim de Moura. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA), Rolim de Moura-RO, 2016.

1. Doenças de plantas. 2. Piperaceas. 3. Fungicidas. 4. Controle alternativo. I. Fernandes, Cléber de Freitas; Vieira Junior, José Roberto. II. Título.

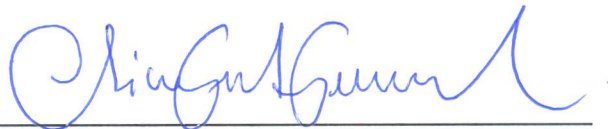
CDU- 632.9

TAMIRIS CHAVES FREIRE

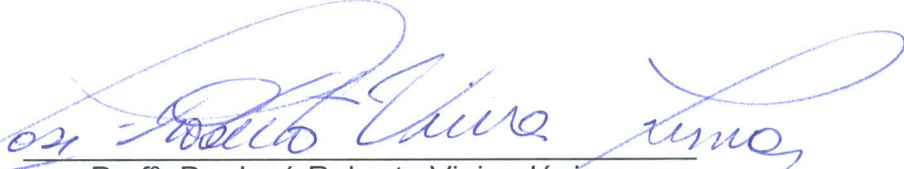
**Extrato vegetal de *Piper* com potencial
atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Ambientais,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestra, Sob a orientação do Dr.
Cléberson de Freitas Fernandes.

APROVADA: 20 de novembro de 2015



Profº. Dr. Cléberson de Freitas Fernandes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Orientador)



Profº. Dr. José Roberto Vieira Júnior
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Co-orientador)



Profº. Dr. Rodrigo Barros Rocha
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Membro externo)

Dedico a Deus, que permitiu que tudo pudesse ser realizado. A toda minha família e ao meu companheiro que sempre me incentivaram em todos os momentos da minha vida. Dedico com amor.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Raimunda Chaves, maior exemplo de força e perseverança e que apesar das dificuldades soube transmitir bem toda sua sabedoria e apoio constante.

Aos meus irmãos Paulo, Antônio, Maria, José e Fabiana Freire pela compreensão.

A todos os professores que contribuíram para o meu aprendizado, em especial aos professores Dr. Cléberson de Freitas Fernandes e Dr. José Roberto Vieira Júnior, pela confiança e orientação e por terem me proporcionado muito além do aprendizado necessário.

Ao Dr. Rodrigo Barros Rocha pelo incentivo e conhecimento necessário para realização das análises estatísticas.

Aos colaboradores Valdir Facundo, Fábio Barbieri e Andrina Guimarães pelo apoio e cessão dos extratos necessários para realização deste trabalho.

Ao Sr. Domingos, que me ensinou tudo o que sei sobre procedimentos básicos de laboratório e pela ajuda no preparo dos experimentos. E ao Sr.

Miranda que me ajudou nos ensaios *in vivo*. Assim como os estagiários: Airton, Aline, Rita, Sara, Deizieny, Nayara, Iasmim e Elize.

Agradeço também a Sulamita, Adriana, Francisca e Juliana pela ajuda na execução do teste de citotoxicidade de células.

Com amor agradeço ao meu companheiro Durvanilson Souza da Silva pela compreensão, apoio, incentivo e carinho.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesta importante caminhada. O meu muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein).

RESUMO

A mela ou teia micélica, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* e a podridão do colo causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii* são doenças importantes para a cultura do feijoeiro devido às enormes perdas em diversas áreas de produção. O controle de agentes patogênicos que atacam diferentes culturas vem sendo realizado ao longo dos anos pela aplicação de agroquímicos. O uso destes produtos, embora eficiente em sua maioria, pode causar danos a saúde do trabalhador e ao ambiente, além de desencadear resistência de microrganismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos etanólicos de folhas de *Piper hispidum*, folhas, frutos e talos de *Piper tuberculatum* e da piplartina no crescimento micelial de *R. solani* e *S. rolfsii*, isolados de feijoeiro comum. Nos ensaios de atividade antifúngica *in vitro* foram avaliadas seis concentrações, sendo: Extratos: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 mg/mL; piplartina: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg/mL. Nos ensaios de citotoxicidade foi avaliado o extrato total de talos de *P. tuberculatum*, em três concentrações (50; 25; 12,5 mg/mL). Para os testes em folhas destacadas foi avaliado o extrato total de talos de *P. tuberculatum*, em três concentrações (25; 12,5; 6,25 mg/mL). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento mais as três testemunhas (água, etanol e fungicida azoxistrobina 0,6 g/L) em todos os testes. Para os testes em casa de vegetação foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo utilizados os mesmos parâmetros do teste em folha destacada, com exceção do número de repetições, que foi de 10 plantas por tratamento. Os resultados demonstraram que os extratos etanólicos de talo de *Piper tuberculatum* em diferentes concentrações, 50; 25 e 12,5 mg/mL, foram eficazes no controle *in vitro* dos fungos *R. solani*. Entretanto, estes apresentaram fitotoxicidade as folhas do feijoeiro em testes *in vivo*, folhas destacadas e casa de vegetação. Embora os extratos tenham apresentado potencial de controle do fungo *S. rolfsii*, nos testes *in vitro*, porém, quando submetido a avaliação *in vivo* este não controlou a doença. Estes extratos também tiveram sua citotoxicidade avaliada em monócitos, tendo apresentado citotoxicidade em todas as concentrações avaliadas. Esta característica não foi observada no extrato etanólico ressuspensionado em água, onde foi observado 100% de viabilidade de células (monócitos). Os resultados sugerem o potencial de *Piper tuberculatum* no controle dos fungos avaliados.

Palavras-chave: Doenças de plantas. Piperaceas. Fungicidas. Controle alternativo.

ABSTRACT

The aerial or micelial net, caused by the fungus *Rhizoctonia solani* and stem rot caused by the fungus *Sclerotium rolfsii* are important diseases for the bean crop due to huge losses in various production areas. The control of pathogens that attack different cultures has been conducted over the years by the application of agrochemicals. The use of these products, while effective in most cases, can damage the health of workers and the environment, as well as trigger resistance of microorganisms. The objective of this study was to evaluate the effect of ethanol extracts of leaves of *Piper hispidum*, leaves, fruits and *Piper tuberculatum* stalks and piplartine on mycelial growth of *R. solani* and *S. rolfsii*, isolated from common bean. The antifungal activity in vitro assays were evaluated six concentrations, as follows: Extracts: 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12; 1.56 mg / ml; piplartine: 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125 mg / ml. In the cytotoxicity assays was assessed total extract of *P. tuberculatum* stalks in three concentrations (50; 25; 12.5 mg / ml). For tests on detached leaves was assessed total extract of *P. tuberculatum* stalks in three concentrations (25, 12.5, 6.25 mg / ml). The experimental design was completely randomized, with four replicates per treatment over the three witnesses (water, ethanol and fungicide azoxystrobin 0.6 g / L) in all tests. For the tests in the greenhouse was used a completely randomized design, being used the same parameters of the test in a separate sheet, except for the number of repetitions, which was 10 plants per treatment. The results showed that the ethanol extract of *Piper tuberculatum* stem in different concentrations, 50; 25 and 12.5 mg / ml was effective in vitro control of the fungus *Rhizoctonia solani*. However, they showed phytotoxicity the bean leaves in vivo tests, detached leaves and greenhouse. Although extracts have shown potential to control fungus *S. rolfsii* in vitro tests, but when subjected to in vivo evaluation this not handle the disease. These extracts also had their cytotoxicity evaluated in monocytes, presenting cytotoxicity at all concentrations tested. This feature was not observed in the ethanol extract resuspended in water, where it was observed 100% cell viability (monocytes). The results suggest the potential of *Piper tuberculatum* in control of this fungus.

Key words: Plant diseases. Piperaceae. Fungicide. Alternative control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Medida realizada para quantificação do crescimento micelial do fungo..... 29
- Figura 2 - Diluição seriada dos extratos com as concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL31
- Figura 3 - Percentual de inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* por extratos do gênero Piper. E.E.T.P.T: Extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* E.E.Fo.P.H: Extrato Etanólico de Folhas de *P. hispidum* (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL).....37
- Figura 4 - Percentual de inibição do crescimento de *Sclerotium rolfsii* por extratos do gênero Piper. E.E.T.P.T: Extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* E.E.Fo.P.T: Extrato Etanólico de Folhas de *P. tuberculatum* (50; 25 e 12,5 mg/mL).....38
- Figura 5 - Curva de crescimento de *Rhizoctonia solani* na presença de extratos do gênero Piper. E.E.T.P.T: Extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* (50; 25 e 12,5 mg/mL). Tratamentos controle com água, etanol e fungicida azoxistrobina.....39
- Figura 6 - Curva de crescimento de *Sclerotium rolfsii* na presença de extratos do gênero Piper. E.E.T.P.T: Extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* (50; 25 e 12,5 mg/mL). Tratamentos controle com água, etanol e fungicida azoxistrobina.....40

- Figura 7 - Crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* na presença de extratos do gênero Piper. E.E.Fr.P.T: Extrato etanólico de fruto de *P. tuberculatum* (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL). Tratamentos controle com água, etanol e fungicida azoxistrobina.....41
- Figura 8 - Crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* na presença de extratos do gênero Piper. E.E.Fr.P.T: Extrato etanólico de fruto de *P. tuberculatum* (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL). Tratamentos controle com água, etanol e fungicida azoxistrobina..... 42
- Figura 9 - Avaliação de viabilidade das células com extrato etanólico de *Piper tuberculatum* e controle com fungicida. A: Extrato etanólico 50 mg/mL e B: Controle com fungicida.....44
- Figura 10 - Média da porcentagem da viabilidade dos extratos de quatro doadores voluntários frente aos extratos aquosos e alcóolicos de talo de *Piper tuberculatum* e suas diluições, durante o período de 1h....45
- Figura 11 - Avaliação da severidade da doença com extrato etanólico de *Piper tuberculatum* em diferentes concentrações e os controles com fungicida, água e etanol.....46
- Figura 12 - Ensaio em folhas destacadas de feijoeiro comum em câmara gerbox na presença de extrato etanólico de talo de *Piper tuberculatum* e do fungo *R. solani*. Controles com fungicida, água e etanol. (Lesões amarelas e brancas indicam fitotoxidez).....47
- Figura 13 - Ensaio em casa de vegetação em plântulas de feijoeiro comum na presença de extrato etanólico de talo de *Piper tuberculatum* e do fungo *R. solani*. Controles com fungicida, água e etanol.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de execução dos testes de viabilidade de células.....	33
Tabela 2 - Resumo da análise de variância dos ensaios de atividade antifúngica dos extratos de Piper frente os fungos <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i>	36
Tabela 3- Viabilidade celular dos monócitos de quatro doadores voluntários mantidas em extrato de <i>Piper tuberculatum</i> com diferentes solventes, após inoculação por 1h.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E.E.D.A.T.P.T	Extrato Etanólico Diluído em Água de Talo de <i>P. tuberculatum</i>
E.E.Fo.P.T	Extrato Etanólico de Folha de <i>Piper tuberculatum</i>
E.E.Fo.P.H	Extrato Etanólico de Folha de <i>Piper hispidum</i>
E.E.Fr.P.T	Extrato Etanólico de Fruto de <i>Piper tuberculatum</i>
E.E.T.P.T	Extrato Etanólico de Talo de <i>Piper tuberculatum</i>
E.E.20%T.P.T	Extrato Etanólico 20% de Talo de <i>Piper tuberculatum</i>
E.E.50%T.P.T	Extrato Etanólico 50% de Talo de <i>Piper tuberculatum</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IBGE	Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPEPATRO	Instituto de Pesquisa de Patologias Tropicais
UNIR	Fundação Universidade Federal de Rondônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Família Piperacea.....	17
3.2 Gênero Piper.....	19
3.3 <i>Piper hispidum</i>	20
3.4 <i>Piper tuberculatum</i>	21
3.5 Piplartina.....	21
3.6 Feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	22
3.7 Mela do feijoeiro.....	23
3.8 Podridão do colo.....	24
3.9 Controle de doenças.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Identificação botânica do material vegetal.....	27
4.2 Preparo de extratos.....	27
4.3 Obtenção dos isolados.....	28
4.4 Ensaios de antibiograma.....	28
4.5 Delineamento experimental.....	29
4.6 Isolamento de monócitos.....	31
4.7 Ensaio de citotoxicidade.....	32
4.8 Ensaios em folhas destacadas.....	33
4.9 Ensaios em casa de vegetação.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Ensaios de Antibiograma.....	36
5.2 Ensaio de citotoxicidade.....	43
5.3 Ensaios em folhas destacadas.....	46
5.4 Ensaios em casa de vegetação.....	47
6 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que o Brasil é um dos países que apresenta maior produção agrícola e diversidade de alimentos. Principalmente em relação à produção de grãos que vem aumentando consideravelmente no país, com 209,5 milhões de toneladas (COMPANHIA..., 2015).

Com o aumento da produção agrícola, houve também um crescimento do uso de agroquímicos. O Brasil assumiu a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos no ano de 2010, sobressaindo assim, como um país altamente poluente no cenário internacional (PELAEZ et al., 2010).

O controle químico apesar de eficiente e econômico (VEGRO; FERREIRA, 2000), pode gerar impactos ambientais, como a poluição do solo, águas e do próprio homem (PIGNATI et al., 2013).

Dados obtidos pelo Relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) de 2012, mostram que cerca de 29% dos alimentos consumidos na mesa dos brasileiros são contaminados por agroquímicos, mostrando que o uso destes se coloca como um problema urgente a ser enfrentado (AGÊNCIA..., 2013).

Outro fator importante que tem contribuído para o desenvolvimento deste setor é a crescente resistência desenvolvida por certos patógenos à determinadas moléculas, fazendo com que estas percam sua capacidade de controlar determinados patógenos (MAGALDI et al., 2002; SAN et al., 2010; GODOY; MEYER, 2014).

As perdas acarretadas por fungos podem comprometer algumas culturas até 30%, especialmente, em regiões de elevadas temperaturas e umidades relativas como o estado de Rondônia (LOPES et al., 2005).

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das culturas mais importantes para a alimentação do povo brasileiro, constituindo assim a base alimentar principalmente de pessoas de baixa renda. Atualmente o feijão apresenta uma produção anual média de 3,4 milhões de toneladas, com uma produtividade média de 1.064 kg/ha (INSTITUTO..., 2015).

Dentre os problemas fitossanitários, a Mela ou Teia micélica do feijoeiro, causada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo *Rhizoctonia solani* Kühn), e a podridão do colo causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii*, estão entre as principais doenças na região amazônica que, dependendo da severidade pode ocasionar perdas totais de produção (BIANCHINI et al., 2005; COSTA et al., 2008; VIEIRA JÚNIOR et al., 2009).

A interação dos componentes patógeno, hospedeiro e ambiente é essencial para que ocorram as doenças em plantas. Porém, a severidade das doenças poderá ser maior ou menor, dependendo de outros fatores dentro de cada um dos três componentes (MICHEREFF, 2001).

Segundo Costa e colaboradores (2008) o controle dessas doenças vem sendo feito, ao longo dos anos quase exclusivamente com o emprego de fungicidas químicos sintéticos. Nos últimos anos, observa-se uma busca crescente por métodos alternativos de controle, que sejam eficientes com o mínimo de impacto ambiental e danos a saúde dos seres humanos (COLTURATO et. al., 2011).

A busca crescente por produtos que apresentem baixa toxicidade ao homem, menor impacto ambiental e menores custos de aquisição vem fazendo crescer a utilização dos recursos naturais renováveis como fonte de novas substâncias bioativas (KIM et al., 2003; MENEZES, 2005; PANG et al., 2012).

Algumas espécies de plantas apresentam uma diversidade de substâncias em sua composição, muitas vezes com potencial fungicida ou fungistático (CELOTO et al., 2008; OLIVEIRA, 2014).

Este trabalho contribuirá para a identificação de novos compostos bioativos com uso potencial para o controle de fitopatógenos de importância para a agricultura brasileira, como é o caso dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar extratos com potencial bioativo para o controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

2.2 Objetivos específicos:

Realizar estudos *in vitro* e *in vivo* de atividade antifúngica de extratos de diferentes partes de plantas do gênero Piper;

Avaliar as taxas de crescimento micelial do fungo *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* diante do uso dos extratos;

Avaliar a citotoxicidade de extratos de plantas do gênero Piper.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os produtos naturais vêm sendo utilizados há muito tempo na agricultura, um exemplo disto é a utilização de extratos vegetais e óleos essenciais de plantas com propriedades inseticidas e fungicidas (MEGURO; BONOMI, 1969; BASTOS; ALBUQUERQUE, 2009).

O efeito positivo de extratos de origem vegetal para controle de microrganismos fitopatogênicos vem sendo divulgados, especialmente por proporcionar uma alternativa para o uso de agrotóxicos, e por possuírem compostos bioativos para o controle de patógenos (SOUZA et al., 2007; RAMALLO et al., 2011; AIRES; OLIVEIRA, 2014).

Estudos mostram que uma grande porção de extratos vegetais têm sido testados quanto ao efeito no controle de diversas pragas e doenças de plantas (PANG et. al., 2012) e para uso em sistemas de produção, como na agricultura orgânica (DINIZ, et al., 2006; DIETRICH et al., 2011).

Os extratos e óleos essenciais podem ser produzidos de diferentes partes das plantas, como folhas, caule, fruto e sementes, sendo testados contra diversos microrganismos fitopatogênicos (MEDEIROS et. al., 2012; MAIA, DONATO; FRAGA, 2015; FONSECA et. al., 2015).

Podemos citar também o uso de diversas plantas medicinais para tal finalidade como: extratos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), aroeirinha (*Schinus terebinthifolius*), arnica-brasileira (*Porophyllum ruderale*), açafraão (*Curcuma longa* L.), coração de negro (*Albizzia lebbbeck* Benth), cravo-da-índia (*Sisymbrium Aromaticum*), carqueja (*Baccharis trimera* DC.) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) (AMARAL et al., 2005; SOUSA, 2008; BONETT et al., 2012; FONSECA et. al., 2015).

3.1 Família Piperaceae

Esta família se encontra distribuída no pantropical, predominando os representantes herbáceos, também existem trepadeiras, arbustos e até mesmo

árvores, representada por cerca de dez gêneros, apresentando folhas inteiras, caule frequentemente articulado, frutos e flores pequenas (JOLY, 2002).

No país podem ser encontradas cinco gêneros da família Piperaceae sendo os gêneros Piper e Peperomia os dois maiores na flora brasileira. O gênero Piper possui mais de 290 espécies e desse total 188 espécies podem ser encontradas na Amazônia (JARAMILLO; MANOS, 2001; GUIMARÃES et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2015). Encontrando-se distribuídas nas margens de florestas, estão entre as que apresentam um grande potencial bioativo (NAVICKIENE et al., 2000; FACUNDO; MORAIS, 2003; XIE et al., 2011; SANTANA, 2012).

Estas são identificadas por apresentarem folhas simples, alternas, opostas ou verticiladas, sésseis ou pecioladas, inteiras, de consistência e formas diversas e por possuírem flores muito pequenas, aperiartadas, protegidas por bracteólas pediceladas ou sésseis, dispostas esparsas ou congestas em espigas, formando umbelas ou dispostas em racemos, axilares ou terminais, opostos ou não às folhas. O fruto é uma drupa, séssil ou pedicelado (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Amplamente estudada por se apresentar como uma das diversas famílias de plantas medicinais, como a espécie *Piper aduncum* L., vulgo aperta-ruão ou pimenta-de-macaco, usada na região de Alto Paraíso de Goiás, GO como adstringente, tônica, queda útero e diarreias (SOUZA; FELFILI, 2006). *Piper mollicomum* Kunth, conhecida como jaborandi e usada para tratar dor na coluna pelos sitiante da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ (MEDEIROS, FONSECA; ANDREATA, 2004).

Assim como a utilização da alfavaca-de-cobra (*Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. para conter diarreia, problemas de coração, conjuntivite e no tratamento dos rins (MOREIRA et al., 2002) e a espécie *Piper regnelli* (Miq.) C.DC. conhecida popularmente como chapéu-de-couro ou pariparoba, utilizada pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS como anti-inflamatório, dor de cabeça, limpar o sangue e má digestão (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006).

Algumas espécies pertencentes a essa família também apresentam em sua composição biomoléculas com propriedades antimicrobiana, inseticidas, fungicidas e/ou fungistático (DIGNANI, 2009; AIRES; OLIVEIRA, 2014; PITON et al., 2014), mostrando o amplo espectro de ação desta diante das diversas enfermidades.

3.2 Gênero Piper

O gênero *Piper* abrange desde árvores, arbustos, ervas e, raramente, lianas e epífitas, geralmente ocupa ambientes sombreados e úmidos de interior, clareiras e bordas de florestas, caracterizadas pelas folhas alternas e espigas ou racemos densamente floridos (TEBBS, 1989; TEBBS, 1993).

Este gênero encontra-se distribuído por todas as regiões do país e em todos os estados, com a região Norte abrigando mais de 185 espécies, 61 destas no estado de Rondônia, 37 em Roraima, 137 no Amazonas, 45 no Amapá, 22 no Maranhão, 14 em Tocantins, 84 no Acre, 67 em Mato Grosso e 104 no Pará (GUIMARÃES et al., 2015).

O gênero *Piper* se destaca dentro da família por conter espécies que apresentam metabólitos secundários, como lignanas e amidas, usados na defesa contra a herbivoria (MIRANDA et al., 2002).

As espécies do gênero *Piper* são amplamente estudadas, tanto na medicina em função das propriedades microbianas exibidas por seus constituintes quanto para controlar pragas e fungos fitopatogênicos de interesse agrônomo, além disso, podem apresentar efeito alelopático em certas culturas (CABRAL, 2011; JUNIOR BORELLA et al., 2012; BIGATON et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; AIRES; LIMA, 2014; ARAÚJO et al., 2014; FIGUEREDO et al., 2014; PITON et al., 2014).

Trabalhos demonstram que as espécies *P. marginatum*, *P. dilatatum*, e *P. callosum* quanto ao potencial de controle do fungo *Crinipella perniciosa*, apresentado total inibição do crescimento do fungo (SILVA; BASTOS, 2007). Óleo essencial de *Piper hispidinervum* mostrou alta atividade de inibição do crescimento dos fungos *Bipolaris sorokiniana*, *F. oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (ZACARONI et al., 2009).

Os dados atualmente disponíveis sobre a identificação e classificação de gêneros e espécies ainda são muito preliminares, dentro da família Piperaceae, havendo sempre possibilidades de mudanças na taxonomia atual (SOUZA; LORENZI, 2005).

3.3 *Piper hispidum*

Esta espécie encontra-se distribuída por todas as regiões do país e em todos os estados, (GUIMARÃES et al., 2015). Esta planta é conhecida como jaborandi ou falso-jaborandi, possui amidas de ação antifúngica e é utilizada popularmente no combate a afecções da pele e cabelos (NAVICKIENE et al., 2000).

Possui porte arbustivo, medindo cerca de 1,8 a 2,0 m de altura, caule cilíndrico, de coloração verde-clara, nodoso, áspero, com lenticelas e ramos mais jovens pubescentes.

As folhas são alternas, simples, curtamente pecioladas, inteiras, de formato ovado, apresentando limbo assimétrico, coloração verde-escura na face adaxial e verde-clara na face abaxial, ápice acuminado e base obtusa.

As folhas de *Piper hispidum* apresentam base assimétrica e pecíolo curto, reto e aproximadamente circular em seção transversal. A nervura central é proeminente em toda a extensão da folha, afilando-se em direção ao ápice (ALBIERO et al., 2006).

Apresenta sistema radicular adventício (extenso), ramificado, constituído por raízes finas que partem da base subterrânea e alargada do caule e assumem posição paralela à superfície do solo (ALBIERO et al., 2006).

Extratos das folhas de *P. hispidum* em trabalho realizado por Santos e colaboradores (2010) demonstra que existem compostos inseticidas nesta planta, apresentando controle sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Assim como extratos das raízes de *P. hispidum* em trabalho realizado por Santos e colaboradores (2011) proporcionando controle sobre o mesmo inseto.

Controle semelhante é demonstrado com a utilização de metabólitos secundários produzidos por 4 fungos endofíticos isolados da planta *Piper hispidum* (G20-20, G65-65, G33-73 e G53-83) contra *Micrococcus luteus*, onde estes apresentaram potencial para o controle da bactéria *M. luteus*, que pode estar associada à ocorrência de algumas doenças em seres humanos (ORLANDELLI, 2011).

3.4 *Piper tuberculatum*

A espécie *P. tuberculatum* está distribuída pelas Américas, do México à Argentina. No país, ocorre nos estados do Amazonas, Pará, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso, São Paulo e Mato Grosso do Sul (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Conhecida como pimenta d'ardo e jaborandi ou falso-jaborandi, respectivamente, (ARAÚJO-JUNIOR et al., 1999; ALBIERO et al., 2006) e são utilizadas, na Paraíba, contra picada de cobra e como sedativos (CHAVES et al., 2006; ARAÚJO-JUNIOR et al., 1999).

Castro e colaboradores (2008) avaliaram o potencial inseticida de frações de extrato aquoso de frutos frescos desidratados de *Piper tuberculatum* sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith), demonstrando a eficiência dos extratos no controle das lagartas, reduzindo o consumo foliar e prolongando o período larval dos insetos.

O extrato de *Piper tuberculatum* apresenta efeito tóxico agudo contra lagartas de terceiro ínstar de *Alabama argilacea*. O potencial inseticida de *Piper tuberculatum* configura-se como alternativa promissora, com vistas à possibilidade de produção comercial de uma nova molécula sintética a ser agregada ao manejo de pragas agrícolas (MIRANDA et al., 2002).

Os óleos essenciais de frutos de *Piper aduncum* e *P. tuberculatum* apresentaram alta atividade contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. Sphaerospermum*. Navickiene e colaboradores (2000) verificaram atividade antifúngica de várias amidas de *Piper tuberculatum*, entre elas piplartina, pelitorina e iperlonguminina.

3.5 Piplartina

A piplartina é um alcaloide/amida conhecida como piperlongumina e encontrado em diversas espécies do gênero *Piper*, tais como *P. longum* L. conhecida como pimenta longa, *P. asborescens* Roxb. (Pimenta do fruto ganchoso),

a espécie *P. tuberculatum* L. (pimenta d'água) entre outras espécies desse gênero (BEZERRA et al., 2008).

Bezerra (2005), avaliado o possível mecanismo de ação da piplartina, verificou que esta se comporta como um agente citotóxico causando alterações no ciclo celular como inibição na síntese de DNA e indução de morte por apoptose e necrose. E quando testadas em modelo pré-clínico *in vivo*, ambas as amidas reduzem o crescimento de tumores da linhagem Sarcoma 180 conferindo um promissor potencial antitumoral.

Porém, as amidas parecem atuar de maneira diferente. A toxicidade também é diferente, piperina é mais tóxica para o fígado que piplartina que por sua vez afeta mais os rins. A amida obtida de *P. tuberculatum* (piplartina) reduziu a oviposição dos parasitas e apresenta efeito esquistossomicida em baixa concentração, o que destaca o potencial da piplartina na atividade antiparasitária. A piplartina reduziu a motilidade e causou morte em todos os helmintos após 24 horas.

As concentrações que não foram letais observou-se redução de até 75% na oviposição das fêmeas de *S. mansoni*, além de ocasionar alterações no tegumento e ventosas (ventral e oral) dos parasitas de maneira dose-dependente; colapso dos tubérculos e descamações constituíram as alterações mais frequentemente observadas nos helmintos tratados (MORAES et al., 2010). A piplartina também tem sido estudada quanto a sua atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioedes* (NAVICKIENE et al., 2000; SILVA et al., 2002).

3.6 Feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) é uma das principais culturas produzidas no mundo, rico em proteínas e ferro, se apresentando como um dos principais alimentos consumidos no Brasil e no mundo, sendo integrante básico na dieta alimentar de diversas populações (VALE e ZAMBOLIM, 1997; BINOTTI et al., 2009; POSSE et al., 2010; FERNANDES et al., 2012; BARBOSA; GONZAGA, 2012).

Considerando as três safras de feijão do país no ano de 2015, estima-se que a área total de plantio poderá chegar a 2.977,3 mil hectares, menor em 11,5% que a

safrã passada. A produçãõ nacional de feijãõ deverã ficar em 3.151,2 mil toneladas, 8,8% menor que a ùltima temporada (COMPANHIA..., 2015).

O consumo nacional tem variado entre 3,3 e 3,6 milhões de toneladas. O consumo poderã ficar em torno de 3.350 mil toneladas, as importações deverãõ ser de 130 mil toneladas e as exportações de 65 mil toneladas (COMPANHIA..., 2015).

Na regiãõ norte do paìs essa produçãõ estã estimada em 74,5 mil toneladas, representando apenas 2,36% da produçãõ nacional e uma produtividade de 764 kg/ha, que pode ser considerada baixa quando comparada com as regiões centro-oeste, sudeste e sul que apresentam mÃdia de produçãõ de 1.989, 1.644 e 1.784 kg/ha respectivamente (COMPANHIA..., 2015).

Na cultura do feijãõ como em qualquer outra cultura, ocorrem fatores negativos que fazem que os produtores tenham danos e perdas na atividade agrìcola causados pelos fitopatãgenos (fungos, bactÃrias e nematãides) (FIALLOS, 2011).

Um dos fatores que contribui para tal produtividade sãõ as doençãs, visto que esta cultura Ã acometida por diversas doençãs, destacando-se a Mela do feijoeiro, causada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo *Rhizoctonia solani* Kùhn), principal doençã na regiãõ amazônica com perdas elevadas, ou atÃ mesmo perdas totais da produçãõ (COSTA et al., 2008; VIEIRA JÙNIOR et al., 2009).

Estima-se que as pragas agrìcolas e outros patãgenos destroem cerca de 10% a 40% da produçãõ agrìcola bruta no mundo Os danos ocasionados por esses agentes podem resultar na elevaçãõ de preçõ dos alimentos e no empobrecimento de sua qualidade bem como no aumento da dependÃncia de produtos importados (PRETTY et al., 1999; GODOY; OLIVEIRA, 2004).

3.7 Mela do feijoeiro

O agente causal desta doençã faz parte da famìlia Ceratobasidiaceae, Gênero *Thanatephorus*, EspÃcie *Thanatephorus cucumeris*, sendo a doençã tambÃm conhecida como teia micÃlica (MICHEREFF, 2001).

Este fungo foi descrito pela primeira vez em 1917 como *Rhizoctonia microsclerotia* e no Brasil foi observada primeiramente no estado de Minas Gerais.

Ocorrendo principalmente nas regiões com temperatura elevada e com chuvas frequentes acompanhadas de alta umidade relativa (VALE; ZAMBOLIM, 1997).

Esta enfermidade afeta a parte aérea da planta, os sintomas iniciais aparecem como pequenas manchas aquosas nas folhas, de cor mais clara que a parte sadia, arredondadas e rodeadas por bordos de cor castanho-avermelhada. A medida que a infecção avança, ocorre uma intensa produção de micélio de cor castanho-claro, em ambas as faces das folhas, formando uma teia micélica que, em condições climáticas favoráveis, (temperatura acima de 30°C, umidade acima de 90% e luminosidade) afeta as folhas adjacentes da própria planta como também as folhas das plantas vizinhas, interligando toda a parte aérea. Normalmente, existe uma grande desfolha do feijoeiro (SOUZA et al., 2005; VIEIRA JÚNIOR; FERNANDES, 2011).

Na região Amazônica é uma doença limitante ao cultivo do feijão e vem ocorrendo frequentemente nos estados de Roraima e Rondônia, devido a combinação de precipitação pluviométrica elevada e temperaturas em torno de 30 °C, que favorecem o surgimento e desenvolvimento desta doença (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006; VIEIRA JÚNIOR et al., 2010).

O fungo *R. solani*, figura como um dos patógenos mais importantes para diversas culturas, ocorrendo em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) (GOULART et al., 2011), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), soja (*Glycine max*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), melancia (*Citrullus lanatus*), alface (*Lactuca sativa*) e feijão-guandu (*Cajanus cajan*) (YOUSSEF, et al., 2012), meloeiro (*Cucumis melo* L.), (SANTOS; PINHEIRO NETO, 2004).

3.8 Podridão do colo

Esta doença é causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc., forma imperfeita do basidiomiceto *Aethelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbr, e pertencente à classe Deuteromycetes da ordem Agonomycetales. Ocorrendo em todas as regiões produtoras de feijoeiro comum. Apresentando-se letal para a planta infectada, independente de seu estágio fenológico (SARTORATO; RAVA, 1994; VALE; ZAMBOLIM, 1997).

Se apresentando mais séria em cultivos de mudas em casa de vegetação na fase do pré-enraizador de algumas culturas do que no campo. Se o substrato dos pré-enraizadores não é desinfestado previamente, *S. rolfsii* pode causar perdas de até 100% (DUARTE et al., 2006).

Os primeiros sintomas apresentados são lesões acinzentadas e aquosas na região do colo das plantas, adquirindo uma coloração castanha, chegando à raiz principal. Nas folhas os sintomas são amarelecimento, desfolha e murcha. Nas áreas afetadas comumente pode-se encontrar micélio de cor branca e pequenos escleródios, inicialmente de coloração branca e tornando-se de cor parda com o tempo (VALE; ZAMBOLIM, 1997).

Podridão do colo é doença bem distribuída em regiões de clima tropical e subtropical. O fitopatógeno apresenta uma ampla magnitude de hospedeiros, atingindo por volta de 500 espécies botânicas e diversas famílias (SERRA; SILVA, 2005; MAFIA et al., 2007). Entre elas plantas de importância econômica como feijão, soja, arroz, milho, algodão, café, entre outras (SARTORATO; RAVA, 1994).

3.9 Controle de doenças

Os vegetais estão cercados por um grande número de inimigos potenciais. Praticamente todos os ecossistemas possuem uma significativa variedade de bactérias, vírus, fungos, nematóides, ácaros, insetos, mamíferos e outros animais herbívoros. Em contrapartida, os vegetais produzem grande variedade de compostos orgânicos que parece não ter função direta no crescimento e no seu desenvolvimento, os metabólitos secundários específicos que agem como uma defesa das plantas contra vários herbívoros e microrganismos patogênicos. Esses metabólitos secundários são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As plantas apresentam, de maneira geral, um eficiente mecanismo de defesa contra o ataque de microrganismos. Este processo de defesa inicia-se desde o momento da interação entre o patógeno e o hospedeiro, o qual desencadeia uma cascata de processos e sinais, os quais são responsáveis pela ativação dos diferentes agentes de defesa (FERNANDES, 2009).

No entanto muitas plantas cultivadas foram artificialmente selecionadas para produzir níveis relativamente baixos desses compostos, o que, por consequência, pode torna-los mais suscetíveis a insetos e a doenças (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Vários princípios e medidas de controles têm sido recomendados visando reduzir as perdas ocasionadas por patógenos, incluindo práticas culturais tais como a rotação de culturas, alteração no espaçamento, incorporação de matéria orgânica, modificação na arquitetura da planta, manejo da irrigação, sendo essenciais para o controle de doenças do feijão, além do uso de variedades resistentes, controle químico, plantio em épocas e locais adequados, assim como o uso de sementes saudáveis (VALE; ZAMBOLIM, 1997; KIMATI et al., 2005).

Em relação à utilização do controle químico, um dos maiores perigos representados diz respeito aos efeitos que eles podem provocar na saúde das pessoas, principalmente daquelas que, no campo ou na indústria, ficam expostas ao contato direto com os agrotóxicos (LONDRES, 2011).

Em um estudo realizado por Moreira e colaboradores (2012) mostrou que o uso indiscriminado do uso de agrotóxicos leva a casos como a contaminação das águas de córregos e da água de chuvas, indicando uma contaminação atmosférica que afeta até mesmo áreas não cultivadas, como os centros urbanos, tornando a extensão de possíveis impactos ou riscos sobre a saúde ambiental de difícil mensuração. Além da deterioração da água potável e impactos sobre a biota.

Dentre as medidas mais indicadas para o controle da mela e da podridão do colo, a utilização de variedades resistentes (VIEIRA JÚNIOR; FERNANDES, 2011). No entanto, essas doenças estão entre as mais difíceis de serem controladas, pois até o momento não se conhecem cultivares resistentes e o controle químico nem sempre é satisfatório (SOUZA et al., 2005; (VIEIRA JÚNIOR; FERNANDES, 2011).

Atualmente a tendência do mercado consumidor é a crescente demanda por alimentos livres de produtos nocivos à saúde do homem que prejudica a qualidade do meio ambiente. Logo a busca por produtos naturais que proporcionem o cultivo de vegetais com qualidade e livres de agroquímicos é uma necessidade para o setor agrícola (BETTIOL; MORANDI, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo, o material vegetal coletado foi avaliado quanto o comportamento de fungos fitopatogênicos diante dos extratos produzidos a partir de folhas, frutos e talos de *Piper tuberculatum*, folhas de *Piper hispidum* e a amina pipartina. Os extratos e frações utilizadas neste trabalho foram fornecidos pelo laboratório de Química de Produtos Naturais da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR.

4.1 Identificação botânica do material vegetal

Para o estudo foram coletadas amostras do material vegetal no município de Porto Velho – Rondônia, e enviado para identificação botânica ao Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e encontra-se depositado sob o número 211724. As espécies foram identificadas como *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum*.

4.2 Preparo dos extratos

Depois de realizada a identificação botânica o material foi colocado para secar em estufa com circulação de ar, à temperatura média de 40 °C por cerca de 48 h, estando secos, os folhas, frutos e talos foram triturados em moinho até obtenção de um pó fino e submetido à extração de seus compostos. A estes foram adicionados etanol, diluindo-se 1g de pó vegetal em 3 mL de solvente seguindo metodologia adaptada de Souza (2004).

A maceração transcorreu à temperatura ambiente (25 °C) ,em recipiente fechado durante 21 dias agitando-se esporadicamente com um bastão de vidro e ao término do tempo o extrato foi filtrado através de uma peneira para retirada das partículas maiores e um funil normal com algodão. Logo após o material foi transferido para um becker e levado para um rotavapor a uma temperatura de 80 °C e uma velocidade de 85 rpm (rotação por minuto), para concentração do material por

meio da evaporação do solvente. O material final foi coletado e transferido para placas de Petri devidamente identificadas e armazenados em geladeira.

4.3 Obtenção dos isolados

Para os testes envolvendo os extratos foram utilizados isolados de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* provenientes de folhas e talos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), oriundas do campo experimental da Embrapa - Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia. As folhas com sintomas de mela e talos com sintomas de mofo foram lavadas em água corrente e posteriormente desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 5%, durante um minuto, depois transferidos para um recipiente contendo água mineral estéril e o excesso de umidade foi retirado com papel filtro.

Os fragmentos contendo parte das lesões foram plaqueados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) em condições assépticas e incubados em estufa de crescimento (BOD) em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, até o momento em que a colônia preencheu completamente a placa de Petri de 90 mm de diâmetro. Após este período, realizou-se a repicagem do fungo, onde discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro contendo as estruturas do fungo foram transferidos para novas placas Petri contendo meio BDA e acondicionados em incubadora tipo BOD para obtenção de uma nova colônia fúngica, as quais foram utilizadas para os testes, segundo metodologia adaptada de Vieira Júnior (2005).

4.4 Ensaios de antibiograma

Os testes foram realizados em capela de fluxo laminar com todos os equipamentos esterilizados, para manter condição de total assepsia. Para o teste dos extratos foram usadas primeiramente as concentrações de 50 mg/mL.

A atividade antifúngica dos extratos foi testada através do método de difusão em poços, vertendo o meio BDA semi-sólido em placas de Petri e após sua solidificação foram feitos três poços com 0,5 cm de diâmetro equidistantes no meio

de cultura e em cada um deles foi adicionado alíquotas 10 µL de extrato, as placas foram vedadas e levadas à geladeira por um período de 24 h, logo após foi adicionado um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro do patógeno desafiante centro da placa, segundo metodologia adaptada de Vieira Júnior (2005). As placas foram vedadas e colocadas uma incubadora BOD. A análise dos resultados foi realizada por meio de observação dos halos de crescimento a partir de 24 h transcorridas de incubação, medindo o diâmetro das colônias no sentido longitudinal e transversal (D_1 e D_2), com auxílio de paquímetro digital.

Foi observado o halo de crescimento do fungo nas placas e comparado com o grupo controle, contendo água, etanol e fungicida Azoxistrobina (0,6 g/L) nos poços. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições para cada extrato e para os grupos controle. Foi avaliado o efeito inibitório das amostras pela quantificação da presença e tamanho de halos de crescimento dos patógenos (Figura 1).

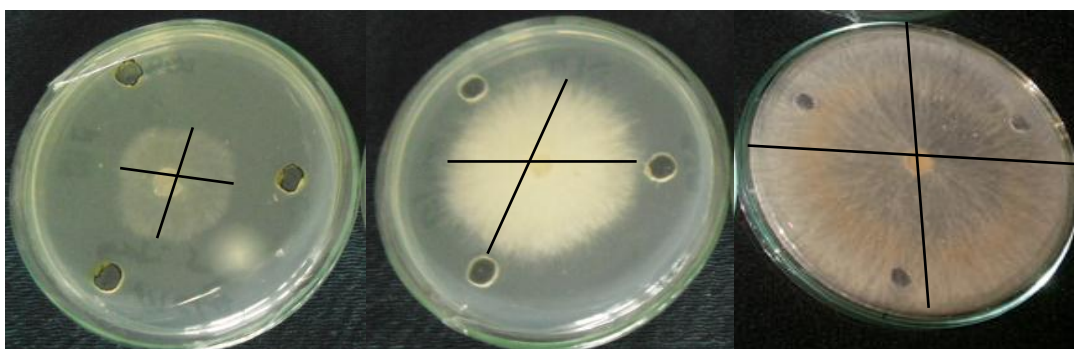


Figura 1 - Medida realizada para quantificação do crescimento micelial do fungo.

4.5 Delineamento experimental

Para quantificar o efeito inibitório dos extratos o diâmetro das colônias no sentido longitudinal e transversal (D_1 e D_2) foi utilizado para estimar a área de crescimento micelial pela aproximação com a área de uma elipse:

$$A = \pi \cdot \frac{D_1}{2} \cdot \frac{D_2}{2} \quad (1)$$

Em que: A : área de crescimento micelial, D_1 : diâmetro no sentido longitudinal, D_2 : diâmetro no sentido transversal.

A redução no crescimento micelial das colônias de *R. solani* e *S. rolfsii*, tratadas com diferentes extratos, foram interpretadas em relação a área de crescimento do tratamento controle para obter uma medida percentual de redução no crescimento micelial, de acordo com a seguinte expressão:

$$F_{inibição} = 100 \cdot \frac{A_i}{A_c} \quad (2)$$

Em que: $F_{inibição}$: fator de inibição do crescimento micelial, A_i : área de crescimento micelial mediante a aplicação do i-ésimo tratamento (extrato), A_c : área de crescimento micelial do tratamento controle.

O efeito inibitório dos extratos sobre o crescimento micelial foi interpretado utilizando análise de variância em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições por tratamento. Para inferir sobre a precisão experimental foi estimado o coeficiente de variação, conforme a notação apresentada por Pimentel Gomes, 2000:

$$CV\% = \frac{100\sqrt{QMR}}{\bar{x}} \quad (3)$$

Em que: $CV\%$: coeficiente de variação experimental, QMR : quadrado médio do resíduo da análise de variância, \bar{x} : média experimental.

Para comparar as médias de tratamentos foi utilizado o teste de Scott Knott a 1% de probabilidade. Segundo Pimentel Gomes, 2000 o teste de Scott Knott também pode ser considerado um teste de agrupamento de médias, uma vez que permite a classificação das médias de tratamentos sem ocorrência de sobreposição entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Genes ANOVA.

Após a identificação dos extratos com potencial bioativo, estes foram submetidas a diluição para identificação das menores concentrações bioativas. Para

a obtenção das concentrações, pesou-se 0,5g do material vegetal, ao qual foi diluídos em 10 mL de etanol e armazenados em geladeira.

Essa primeira diluição constitui o extrato puro (100 mg/mL). Para compor a concentração de 50 mg/mL, retirou-se 500 μ L da primeira diluição (100 mg/mL) e acrescentou-se 500 μ L de etanol, assim sucessivamente nas concentrações 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL (Diluição seriada) (Figura 02). As concentrações obtidas foram testadas contra os patógenos, com o objetivo de identificar as frações ativas.

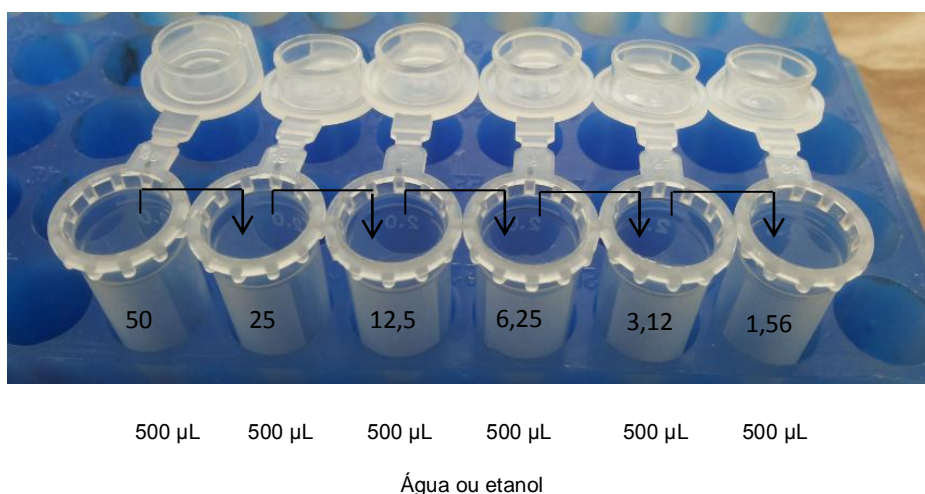


Figura 2 - Diluição seriada dos extratos com as concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL.

As frações ativas selecionadas foram avaliadas quanto à capacidade de controle da doença em ensaios em folhas destacadas e casa de vegetação e quanto a capacidade de atuarem como indutores de resistência utilizando mudas de feijoeiro, sob condições controladas de temperatura e umidade.

4.6 Isolamento de monócitos

Ensaio para determinação da citotoxicidade dos extratos foram conduzidos seguindo a metodologia descrita por Pontes e colaboradores (2014), com adaptações. O material celular foi obtido de doadores que se auto-declararam saudáveis, na faixa etária de 18-30 anos, dos quais foram obtidos, previamente, o

termo de consentimento livre e esclarecido sobre a concordância em participar do estudo, no momento da colheita de sangue. O estudo encontra-se aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Medicina Tropical de Investigação (número 108/2010).

Foi realizada a assepsia do local de colheita do sangue e este foi coletado em tubos de vácuo contendo heparina. Para a separação das células foi utilizado o reagente Histopaque 1077. Para tal, este foi previamente adicionado a tubos falcon e, em seguida, foi adicionado, cuidadosamente, o sangue, na proporção de (2:1), respectivamente. A seguir o material foi centrifugado (350 x g, 30 min, temperatura ambiente). Os monócitos foram coletados e transferidos para outro tubo falcon. Em seguida foram lavados com tampão PBS pH 7,4, centrifugados (600 x g, 10 min, temperatura ambiente), coletados e transferidos para outro tubo (PONTES et al., 2014).

4.7 Ensaio de citotoxicidade

Os monócitos (2×10^5 células/mL) foram resuspensores em meio de cultura RPMI 1640 (Criado pelo Roswell Park Memorial Institute, meio sintético complexo) suplementado com gentamicina (100 ug/mL), L-glutamina (2 mM) e 10% de soro fetal bovino. Para a realização do ensaio, 50 μ L da suspensão de células foi adicionado a placa de 96 poços, seguido da adição de 50 μ L dos extratos avaliados, etanólico e aquoso, nas diferentes concentrações (50; 25 e 12,5 mg/mL). A placa foi, então, incubada por 1h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada (5% de CO₂). Após a incubação, 20 μ L de azul de tripan 1% foi adicionado e a viabilidade das células avaliada, sob microscópio óptico, em câmara de Neubauer. Para os tratamentos controle foram utilizados etanol absoluto, etanol 20% e fungicida. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis (PONTES et al., 2014) (Tabela 1).

Tabela 1 - Tabela de execução dos testes de viabilidade de células

EXTRATOS (mg/mL)	CÉLULA (μ L)	MEIO (μ L)	EXTRATO (μ L)	FUNGICIDA (μ L)	ETANOL (μ L)	VOLUME FINAL (μ L)
E.E.50%T.P.T 50	50	-----	50	-----	-----	100
E.E. 50%T.P.T 25	50	25	25	-----	-----	100
E.E. 50%T.P.T 12,5	50	37,5	12,5	-----	-----	100
E.E. 20%T.P.T50	50	-----	50	-----	-----	100
E.E. 20%T.P.T25	50	25	25	-----	-----	100
E.E. 20%T.P.T12,5	50	37,5	12,5	-----	-----	100
E.E. DA.T.P.T50	50	-----	50	-----	-----	100
E.E. DA.T.P.T25	50	25	25	-----	-----	100
E.E. DA.T.P.T12,5	50	37,5	12,5	-----	-----	100
CONTROLE – H ₂ O	50	50	-----	-----	-----	100
FUNGICIDA	50	40	-----	10	-----	100
ETANOL 20%	50	30	-----	-----	20	100
ETANOL 50%	50	-----	-----	-----	50	100

4.8 Ensaios em folhas destacadas

Folhas de feijão da variedade carioca foram destacadas de plântulas cultivadas em casa de vegetação com 14 dias após o plantio e acondicionadas em caixas de gerbox de 11,5 cm² contendo esponja, papel de 10 mm cada e uma tela preta de 8 cm². No laboratório, as folhas foram destacadas da planta, sendo em seguida lavadas com água destilada, secas em papel toalha e colocadas em caixas de gerbox contendo cerca de 20 mL de água destilada para manutenção da umidade das folhas (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

Em seguida com o auxílio de um borrifador, as folhas foram aspergidas com cerca de 250 μ L de suspensão de micélios (1×10^6 frag.micélios/mL) e incubadas em câmaras BOD com temperatura ajustada para 25 °C por um período de 24 h, após esse período aplicou-se nas folhas cerca de 250 μ L dos extratos, até a cobertura total da área foliar, logo após as folhas destacadas foram novamente incubadas em câmaras BOD com temperatura ajustada para 25 °C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada parcela constituída por uma caixa de gerbox contendo uma folha destacada. Após 6 dias os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de médias por meio do programa AFsoft® (SILVA et al., 2009).

4.9 Ensaios em casa de vegetação

O cultivo do feijoeiro foi efetuado em copos plásticos de 500 mL contendo solo na proporção 3:1:1 (Argila: Areia: Esterco) com pH 7,1. A semeadura foi realizada colocando-se 3 sementes por copo, onde estes foram cobertos com uma camada de solo de cerca de 1 cm.

Para os ensaios *in vivo* com *R. solani* foram utilizadas plantas de feijoeiro com 14 dias de plantio. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de fragmentos de micélios do patógeno (1×10^6 frag.micélios/mL). Para avaliação de indução de resistência primeiramente aplicou-se os tratamentos com 25, 12,5 e 6,25 mg/mL de extrato bruto de talo de *P. tuberculatum* e mais três controles (água, etanol e fungicida (Azoxistrobina 0,6 g/L)) nas folhas primárias da planta e após 24 horas as mudas receberam a suspensão fúngica e para avaliação de controle do patógeno, primeiramente aplicou-se a suspensão fúngica e depois os tratamentos com 25, 12,5 e 6,25 mg/mL de extrato bruto de *P. tuberculatum* e mais três controles (água, etanol e fungicida (Azoxistrobina 0,6 g/L)). Logo após foi quantificada a severidade da doença, quando do aparecimento dos primeiros sintomas.

Para os ensaios *in vivo* com *S. rolfsii* foram utilizadas plantas de feijoeiro com 10 dias de plantio. As plantas foram inoculadas com disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro do patógeno.

Para avaliação de indução de resistência primeiramente aplicou-se os tratamentos com 25, 12,5 e 6,25 mg/mL de extrato bruto de talo de *P. tuberculatum* e mais três controles (água, etanol e fungicida) no caule das plantas e após 24 h as mudas receberam a suspensão fúngica e para avaliação de controle do patógeno, primeiramente aplicou-se a suspensão fúngica e depois os tratamentos com 25, 12,5 e 6,25 mg/mL de extrato bruto de *P. tuberculatum* e mais três controles (água, etanol

e fungicida). Logo após foi quantificada a presença da doença, quando do aparecimento dos primeiros sintomas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 10 repetições por tratamento. Foram utilizados como controles o fungicida Azoxistrobina, (0,6 g/L) etanol e água.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Ensaios de Antibiógrama

Para avaliar o potencial bioativo dos extratos etanólicos de *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum*, sobre os fungos *R. solani* e *S. rolfsii*, extratos de diferentes partes das plantas foram avaliadas em testes de atividade antifúngica.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância - ANOVA, para avaliação da existência de diferença entre os percentuais de inibição de crescimento dos diferentes extratos e dos controles avaliados no trabalho. O resumo da análise está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância dos ensaios de atividade antifúngica dos extratos de Piper frente os fungos *R. solani* e *S. rolfsii*

ANOVA	<i>R. solani</i>		<i>S. rolfsii</i>	
F.V	G.L	F	G.L	F
Tratamentos	8	102,95**	5	52,01**
Resíduos	27	---	18	---
Total	35	---	23	---
Média	35,91	---	31,80	---
C.V. (%).	14,35	---	21,90	---

F.V. – Fonte de variação; G.L. – Graus de Liberdade; F. – Teste de ANOVA. **Significância a 1% de probabilidade.

Ambos os experimentos mostraram coeficiente de variação de baixo a mediano, estando os mesmos dentro de uma faixa considerada aceitável, permitindo inferir que os mesmos apresentaram alta e média precisão para os testes com *R. solani* e *S. rolfsii*, respectivamente (PIMENTEL GOMES, 2000).

Segundo Pimentel Gomes (2000) valores de coeficientes de variação de até 10% podem ser considerados baixos e de alta precisão, valores entre 10 e 20% são de boa precisão, valores de 20 a 30% de boa precisão.

Para o teste de atividade antifúngica contra o fungo *R. solani*, significativos níveis de inibição do crescimento fúngico foram observados nos extratos etanólicos de talo nas concentrações de 50 e 25 mg/mL (Figura 3).

As concentrações 25 e 50 mg/mL apresentaram efeito significativo de acordo com o teste F a 1% de probabilidade.

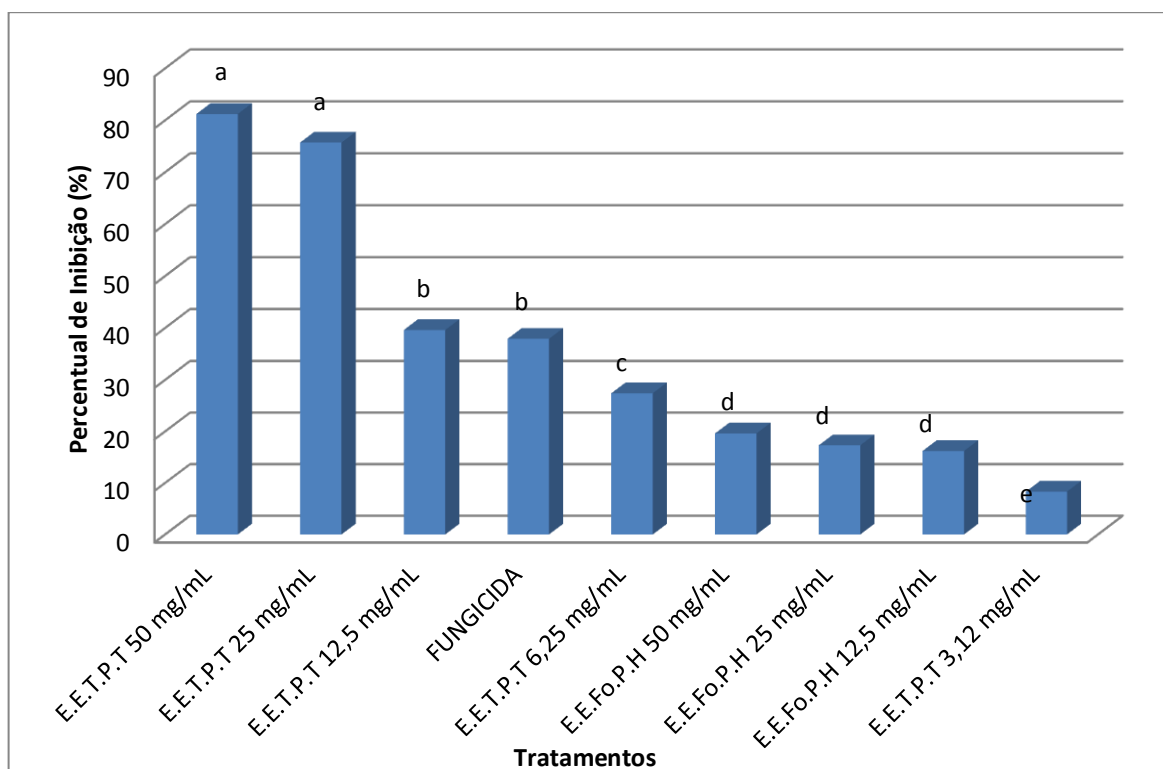


Figura 3 - Percentual de inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* por extratos do gênero Piper. E.E.T.P.T: Extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* E.E.Fo.P.H: Extrato Etanólico de Folhas de *P. hispidum* (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL). Médias identificadas por diferentes letras foram significativas de acordo com o teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

Nestas concentrações foram observados inibição do crescimento de *R. solani* na ordem de 81,2% e 75,7%, respectivamente. Comparado com o controle com fungicida, estes valores foram cerca de 2,0 vezes mais eficientes. Esta eficiência no controle de *R. solani* também foi observada na concentração de 12,5 mg/mL, que apresentou fator de inibição na ordem de 40%, ainda um pouco superior ao fungicida (37,9%) (Figura 3).

O extrato etanólico de talo de *Piper tuberculatum* também mostrou atividade significativa para o controle do fungo *Sclerotium rolfsii* nas atividades *in vitro*. Maiores atividades de inibição foram observadas nas concentrações de 50 e 25 mg/mL, com valores variando de 62,2% e 53,1%, respectivamente (Figura 4).

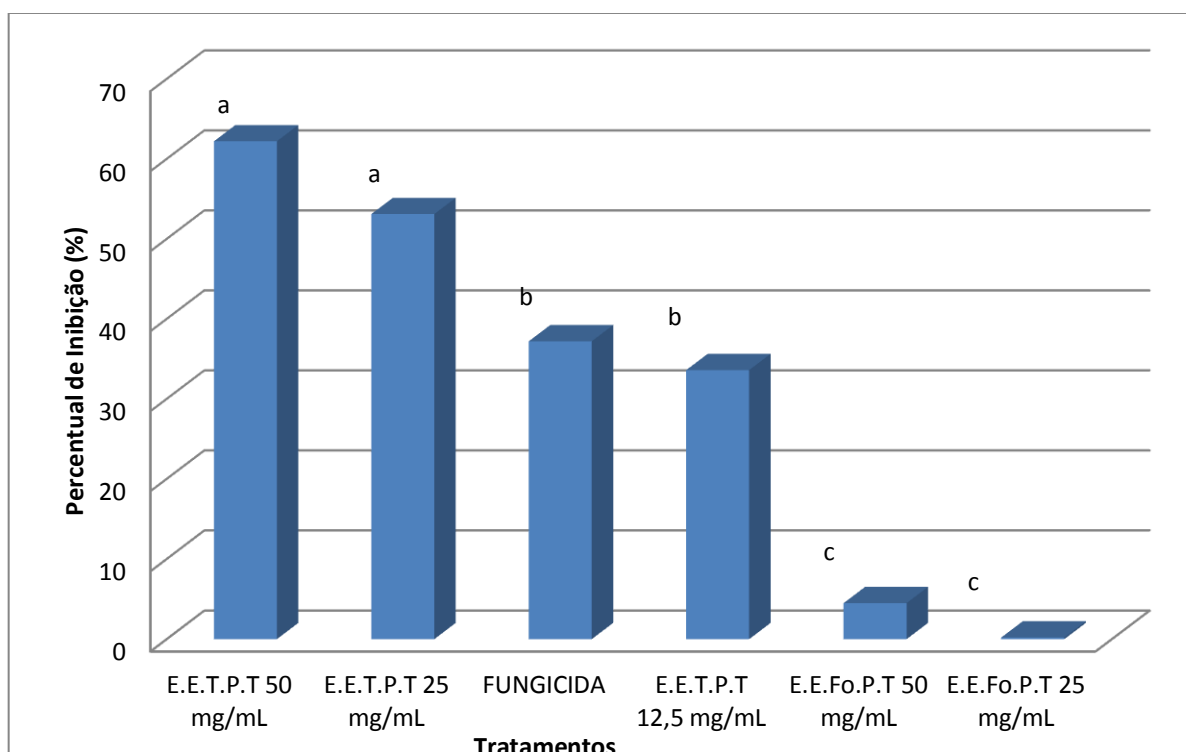


Figura 4 - Percentual de inibição do crescimento de *Sclerotium rolfsii* por extratos do gênero *Piper*. E.E.T.P.T: Extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* E.E.Fo.P.T: Extrato Etanólico de Folhas de *P. tuberculatum* (50; 25 e 12,5 mg/mL). Médias identificadas por diferentes letras foram significativas de acordo com o teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

Quando comparada com a atividade do fungicida, estes valores foram de 1,7 e 1,4 vezes maiores, respectivamente. Na concentração de 12,5 mg/mL, o extrato não mostrou diferença significativa para o controle com o fungicida, evidenciando, assim, o potencial deste em controlar o fungo *S. rolfsii*.

A Figura 5 mostra a curva de crescimento do fungo *R. solani* frente aos extratos etanólicos de talo do *Piper tuberculatum* nas concentrações 50, 25 e 12,5 mg/mL. Os controles com fungicida, água e etanol também são apresentados no gráfico.

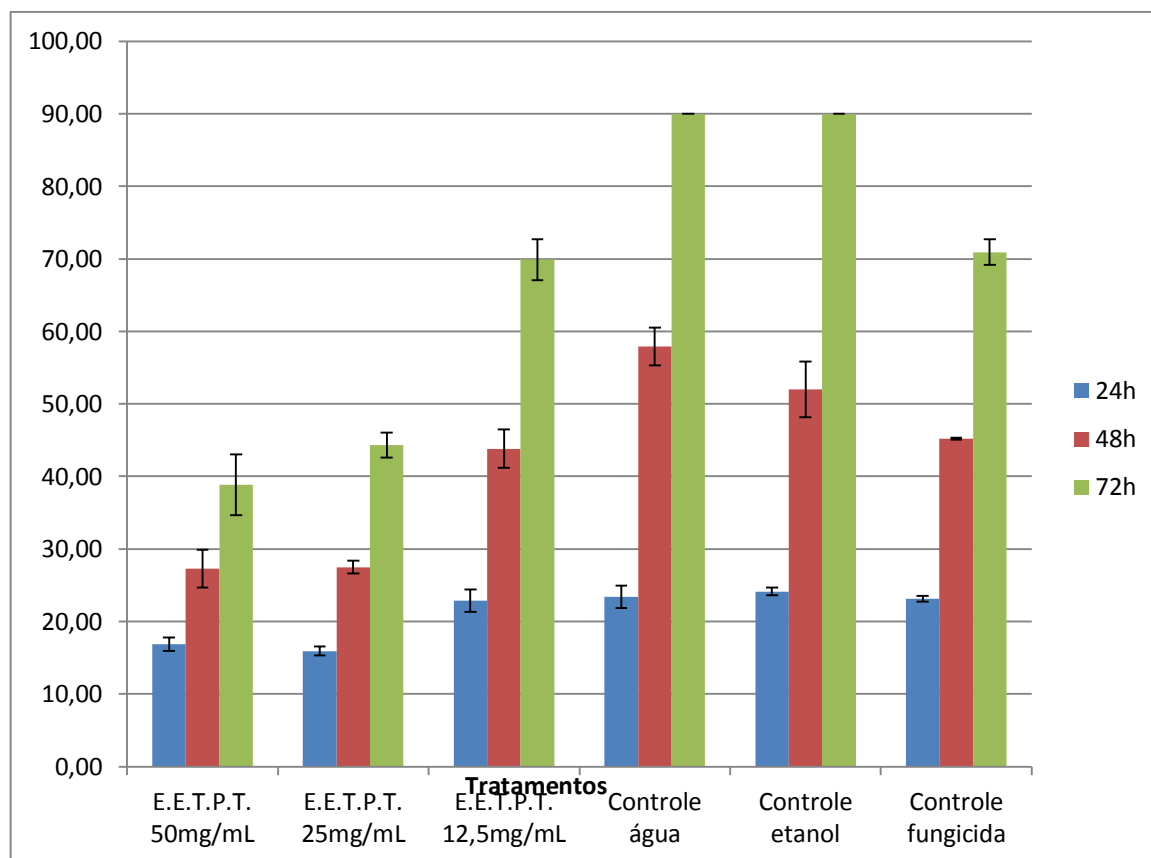


Figura 5 - Curva de crescimento de *Rhizoctonia solani* na presença de extratos do gênero Piper. E.E.T.P.T: Extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* (50; 25 e 12,5 mg/mL). Tratamentos controle com água, etanol e fungicida azoxistrobina.

Neste caso constatou-se redução do diâmetro da colônia de *R. solani* nas doses 50, 25 e 12,5 mg/mL. Doses de 6,25, 3,12 e 1,56 mg/mL não mostraram efeito inibitório pois estes se assemelharam com os controles com água e etanol e diferiram-se do controle com fungicida.

As avaliações com os extratos de talo de *P. tuberculatum* no tempo 72 horas mostraram valores de crescimento micelial de 38,85; 44,32 e 69,90 mm (90 mm=100%) para as doses decrescentes de extrato (50, 25 e 12,5 mg/mL), respectivamente. Os valores de crescimento nos tratamentos controle foram água e etanol, 90 mm e fungicida 72,92 mm.

A curva de crescimento do fungo *Sclerotium rolfsii* na presença dos extratos etanólicos de talo de *Piper tuberculatum* é apresentada na Figura 6. Nesta figura são

apresentadas as concentrações de 50, 25 e 12,5 mg/mL, além do controle positivo com fungicida e dos controles com água e etanol.

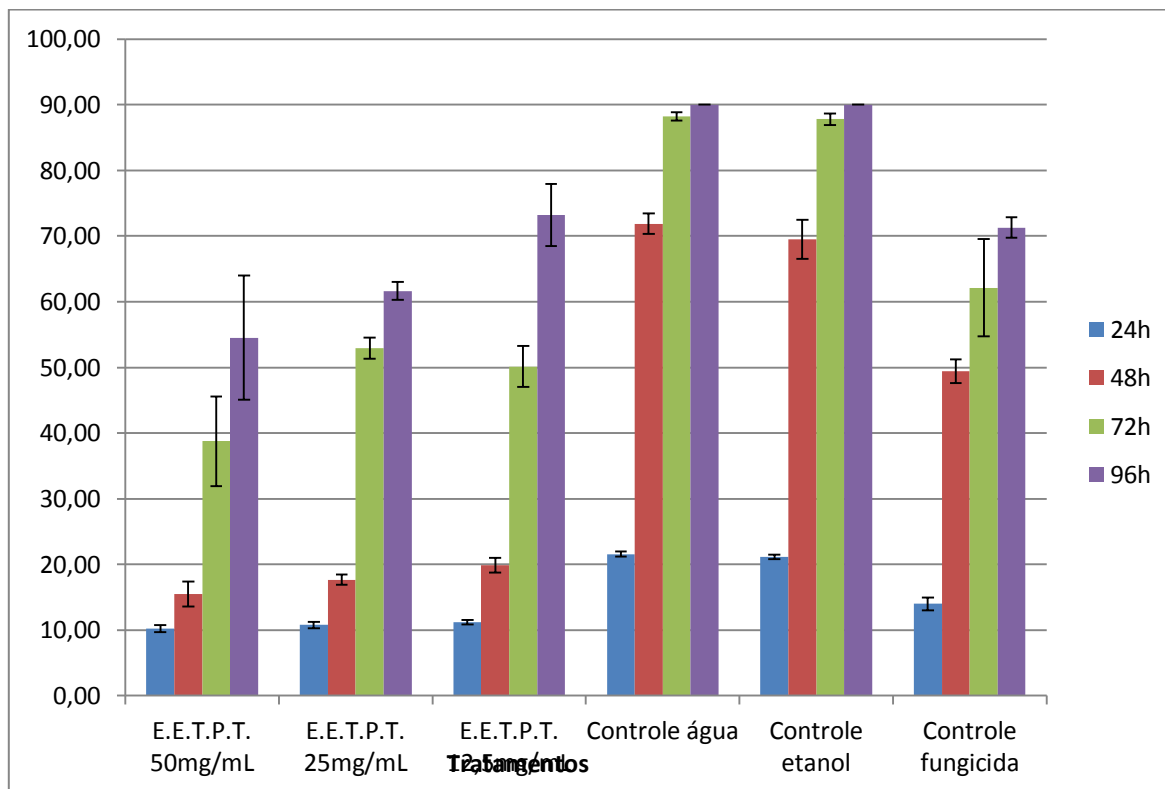


Figura 6 - Curva de crescimento de *Sclerotium rolfsii* na presença de extratos do gênero Piper. E.E.T.P.T: Extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* (50; 25 e 12,5 mg/mL). Tratamentos controle com água, etanol e fungicida azoxistrobina.

O efeito de redução no crescimento micelial também foi observado quando os extratos etanólicos de *P. tuberculatum* foram colocados em contato com o fungo *S. rolfsii*. Constatou-se redução do diâmetro da colônia nas doses 50, 25 e 12,5 mg/mL. Doses de 6,25, 3,12 e 1,56 mg/mL não mostraram efeito inibitório, e se assemelharam com os controles com água e etanol e diferiram-se do controle com fungicida.

As avaliações com os extratos de talo de *P. tuberculatum* no tempo 96 horas mostraram valores de crescimento micelial de 54,53; 61,63 e 73,21 mm (90 mm=100%) para as doses decrescentes de extrato (50, 25 e 12,5mg/mL),

respectivamente. Os valores de crescimento nos tratamentos controle foram água e etanol, 90 mm e fungicida 71,30 mm.

Na avaliação do crescimento micelial utilizando extratos etanólicos de frutos de *P. tuberculatum* constatou-se que estes não inibiram o diâmetro da colônia do fitopatógeno *R. solani* em todas as doses testadas visto que estes se assemelharam com os controles com água e etanol (Figura 7).

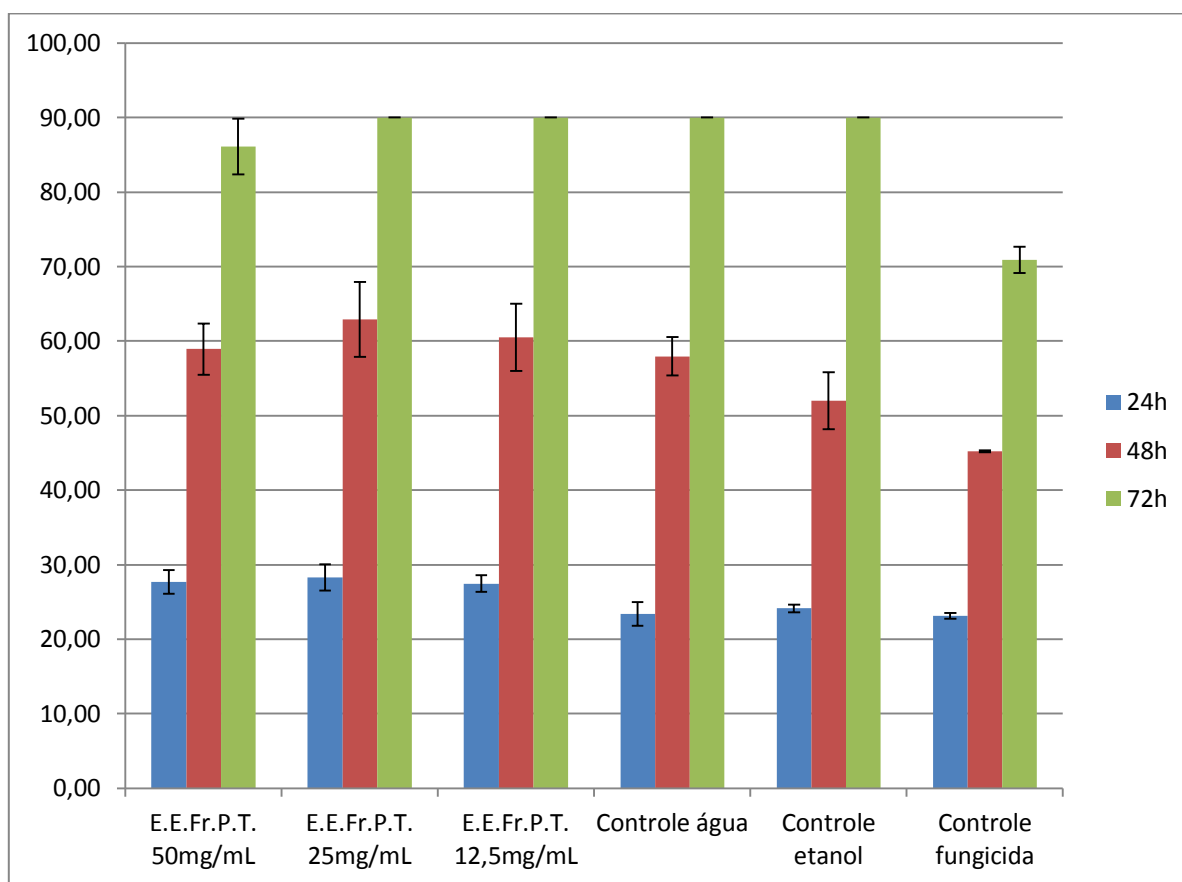


Figura 7 - Crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* na presença de extratos do gênero Piper. E.E.Fr.P.T: Extrato etanólico de fruto de *P. tuberculatum* (50; 25 e 12,5 mg/mL). Tratamentos controle com água, etanol e fungicida azoxistrobina.

Resultado semelhante foi obtido com os extratos etanólicos de frutos de *P. tuberculatum* contra o fungo *S. rolfsii* (Figura 8).

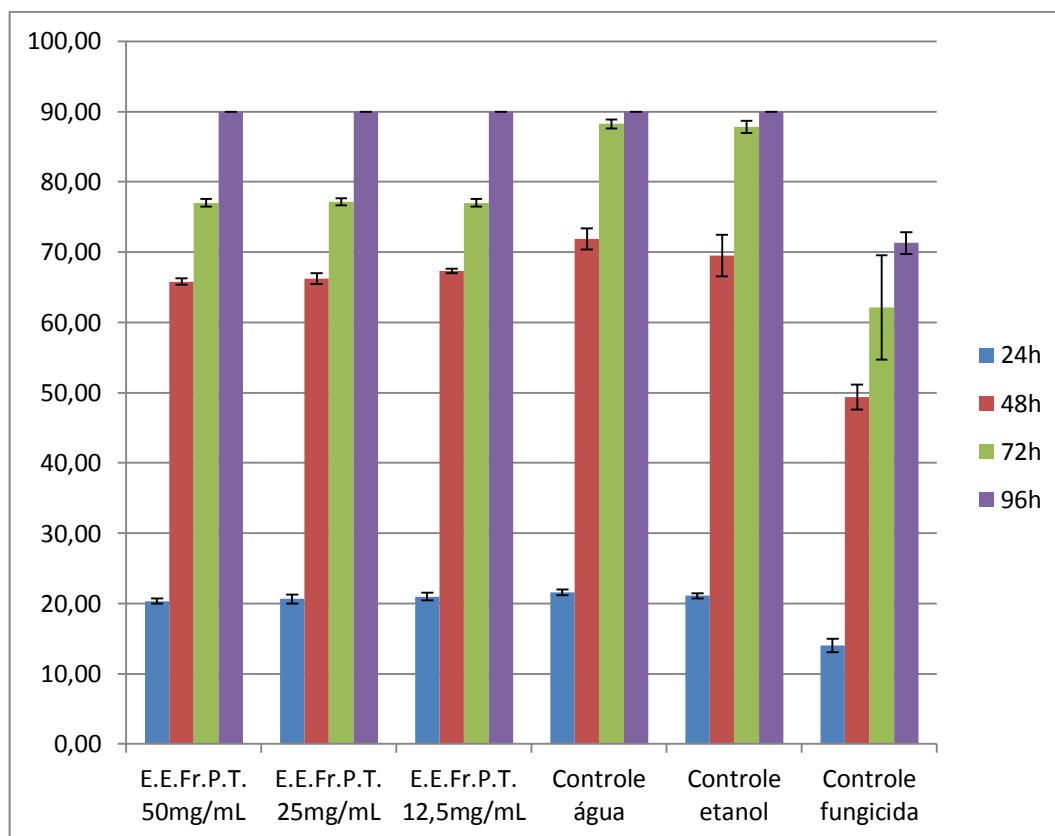


Figura 8 - Crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* na presença de extratos do gênero Piper. E.E.Fr.P.T: Extrato etanólico de fruto de *P. tuberculatum* (50; 25 e 12,5 mg/mL). Tratamentos controle com água, etanol e fungicida azoxistrobina.

As avaliações com os extratos etanólicos de folha e fruto de *P. tuberculatum* contra o fungo *R. solani*, no tempo de 72 horas, mostraram um crescimento micelial de 85,93; 87,5 e 90 (90 mm=100%) e 86,1; 90 e 90 mm para as doses decrescentes de extrato (50; 25 e 12,5 mg/mL), respectivamente.

Estes valores foram semelhantes aos dos tratamentos controle com água e etanol, 90 mm, enquanto que com o fungicida o crescimento foi de 70,92 mm. Resultados semelhantes foram obtidos para o fungo *S. rolfsii*. As avaliações feitas com extratos etanólicos de folhas de *P. hispidum* e da amida piplartina não apresentaram diferença significativa entre o crescimento do diâmetro do fungo *S. rolfsii* e o controle com água.

O emprego dos extratos vegetais é bastante conhecido, caso do extrato de camomila que inibiu 52% o crescimento micelial de *Fusarium* sp. e o fungo *Botrytis*

sp. que foi inibido com os extratos de alecrim, eucalipto e menta (CAMATTI-SARTORI et al., 2011; SILVA et al., 2012) e o cravo-da-índia controlou 100% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e *P. oryzae*. Já Lima e Ferreira Neto (2014) verificaram que o extrato etanólico dos frutos de *S. grandiflorum* apresentou ação inibitória sobre a *R. solani* *in vitro*.

Extratos produzidos a partir de folhas de pimenta e folhas de Jamelão também foram testados e se mostraram eficientes, reduzindo a severidade da doença em 40%, quando comparado o controle com água (VIEIRA JÚNIOR et al., 2011).

Medeiros e colaboradores (2012) trabalhando com extrato etanólico de *Senna alata* para o controle de *Fusarium oxysporum* demonstraram resultados semelhantes, onde houve diferença entre as diferentes partes da planta testadas. Demonstrando que extrato de raiz e vagem foram os mais eficientes em inibir o crescimento micelial do fungo na concentração 500 µg mL⁻¹.

Esta característica também foi evidenciada por Rodrigues e colaboradores (2014), em estudo com extratos de sementes e folhas de *Annona muricata* contra *Aphis craccivora*, onde observaram que o extrato hexânico da semente na concentração 0,5% apresenta eficiência para o manejo do pulgão-preto do feijão-caupi, já o extrato hexânico das folhas se apresentou ineficiente.

Isso provavelmente se deve ao fato de existirem diferentes constituintes e em diferentes concentrações em todas as partes das plantas, essa característica pode variar da espécie da planta, parte utilizada e finalidade (FACUNDO et al., 2008; MEDEIROS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014).

Além disso, Moralesa e colaboradores (2013) encontraram diferenças na composição de óleos da espécie *P. hispidum*, atribuindo tal fato à localização geográfica, sazonalidade, idade fisiológica da planta e época de colheita.

5.2 Ensaios de citotoxicidade

Os resultados da viabilidade das células (monócitos) mantidas em diferentes solventes de *Piper tuberculatum*, no período de 1h à temperatura de 20 °C, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Viabilidade celular dos monócitos de quatro doadores voluntários mantidas em extratos de *Piper tuberculatum* com diferentes solventes, após incubação por 1h.

Extratos de <i>Piper</i>	Células (Monócitos)	
	Viáveis	Não viáveis
E.E.T.P.T	-	X
E.E.20%T.P.T	-	X
E.E.D.A.T.P.T	X	-
CONTROLE – H ₂ O	X	-
FUNGICIDA	X	-
ETANOL 20%	-	X
ETANOL 50%	-	X

Os extratos E.E.T.P.T e E.E.20%T.P.T nas concentração (50; 25 e 12,5 mg/mL) e os controles com etanol 20% e etanol 50%, apresentaram nula viabilidade celular, com taxa de 100% de rompimento da membrana dos monócitos. Apesar de sua leitura ter se mostrado excessivamente turva (E.E.T.P.T) ao microscópio óptico, dificultando a avaliação da viabilidade celular, quando comparado com a visualização dos demais controles (Figura 9).

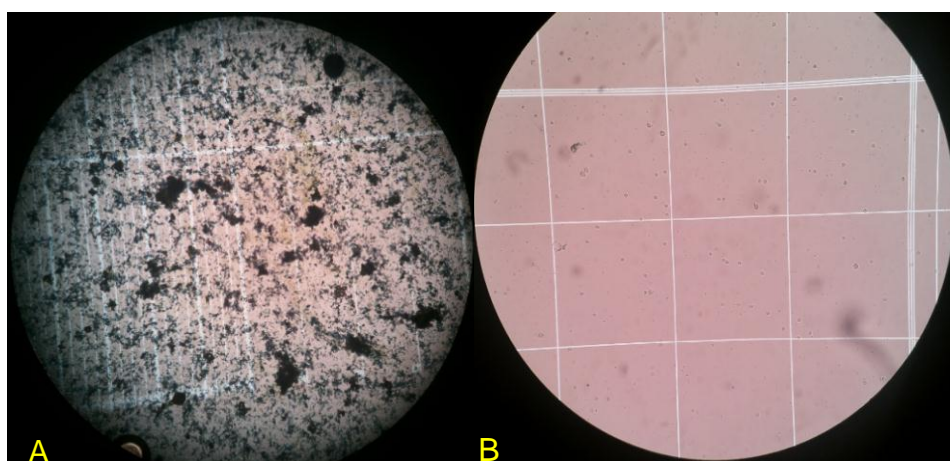


Figura 9 - Avaliação de viabilidade das células com extrato etanólico de *Piper tuberculatum* e controle com fungicida. A: Extrato etanólico 50 mg/mL e B: Controle com fungicida.

Apenas o extrato diluído em água demonstrou desempenho satisfatório na viabilidade das membranas dos monócitos em todas as concentrações testada (50; 25 e 12,5 mg/mL), não diferindo estatisticamente do controle negativo (meio) e do controle positivo (fungicida), apresentando 100% de viabilidade após 1 hora (Figura 10).

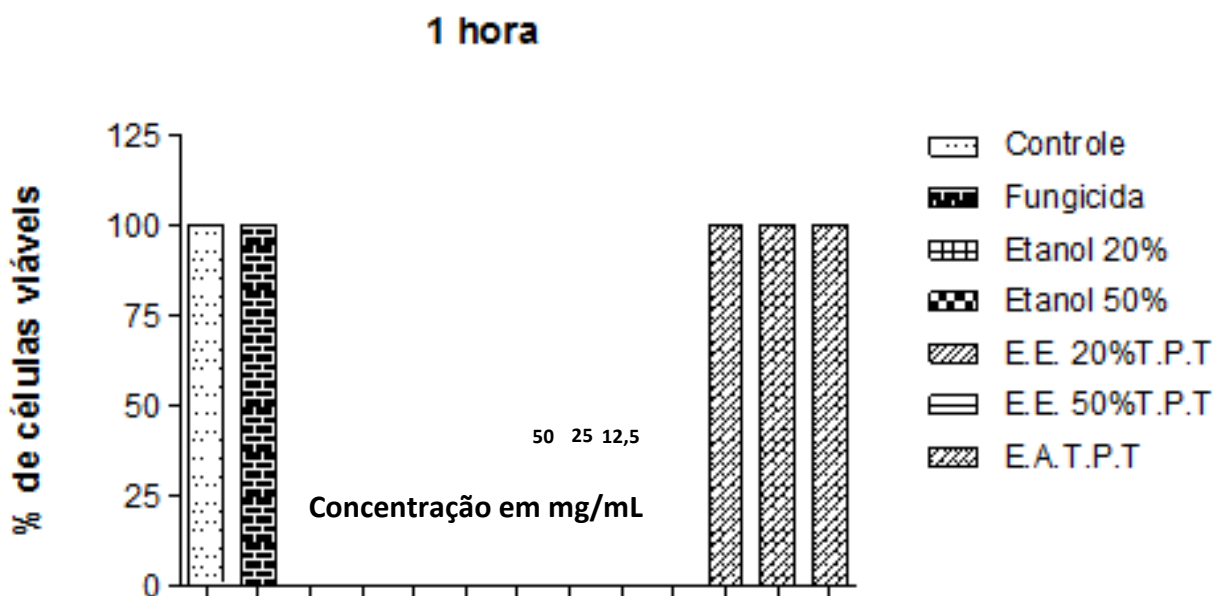


Figura 10 - Média da porcentagem da viabilidade dos extratos de quatro doadores voluntários frente aos extratos aquosos e alcóolicos de talo de *Piper tuberculatum* e suas diluições, durante o período de 1h.

Os resultados demonstram em geral que os monócitos não são afetados com a exposição a extratos aquosos e alcóolicos de *Piper tuberculatum*, comprovando parcialmente que estes não são citotóxicos para mamíferos.

Resultados semelhantes foram observados por Matioli (2014), ao avaliar o potencial citotóxico e antioxidante de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Canela), *Origanum vulgare* L. (Orégano), *Petroselinum sativum* L. (Salsa), *Piper nigrum* L. (Pimenta do reino), *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre), e *Ocimum basilicum* L. (Manjericão), onde estes não apresentaram nenhuma atividade citotóxica nas concentrações avaliadas.

5.3 Ensaios em folhas destacadas

Os resultados obtidos por meio das avaliações *in vivo* com folhas destacadas foram mensurados utilizando-se o programa AFsoft®. Os resultados obtidos mostraram uma baixa severidade média no tratamento com o extrato etanólico de talo de *P. tuberculatum* na dose de 25 mg/mL. Entretanto, de maneira geral, não podemos afirmar que este extrato é realmente eficiente em virtude de alto coeficiente de variação apresentado. O resultado nos permite apenas inferir que o mesmo apresentou potencial para controlar o fungo *R. solani* (Figuras 11 e 12).

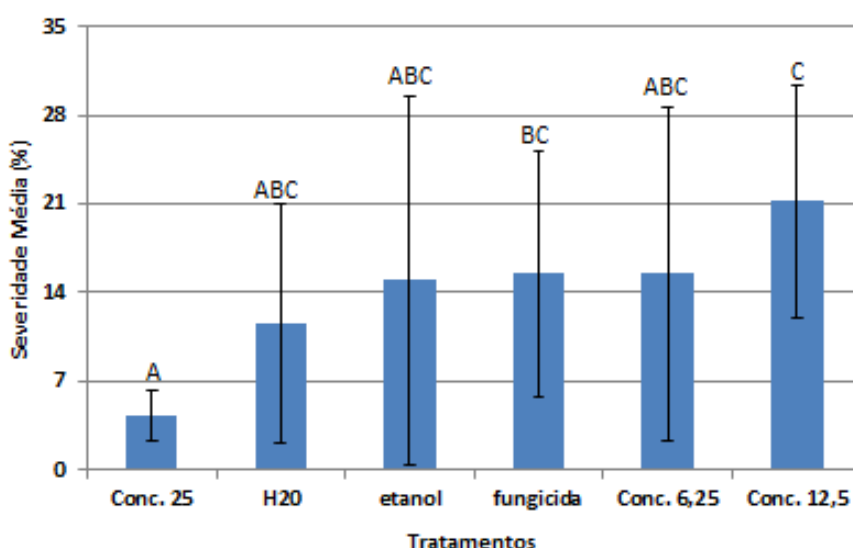


Figura 11 - Avaliação da severidade da doença com extrato etanólico de *Piper tuberculatum* em diferentes concentrações e os controles com fungicida, água e etanol.

O alto coeficiente de variação (36,32) pode estar relacionado ao baixo número de repetições utilizadas, bem como pela ocorrência de fitotoxicidade observada em algumas folhas de feijoeiro tratadas com os extratos etanólicos testados.



Figura 12 - Ensaio em folhas destacadas de feijoeiro comum em câmara gerbox na presença de extrato etanólico de talo de *Piper tuberculatum* e do fungo *R. solani*. Controles com fungicida, água e etanol. (Lesões amarelas e brancas indicam fitotoxidez).

5.4 Ensaios em casa de vegetação

Os resultados obtidos por meio das avaliações *in vivo* em casa de vegetação, em todas as concentrações testadas apresentaram-se fitotóxicas para as folhas de feijoeiro comum, impossibilitando a avaliação de severidade máxima da doença (Figura 13).

Os resultados das avaliações contra o fungo *S. Rolfsii* com extratos de talo de *P. tuberculatum* nas doses (25; 12,5 e 6,25) não apresentaram controles eficientes, obtendo-se 100% de morte das plantas avaliadas.

O principal sintoma de fitotoxicidade no feijoeiro foi o aparecimento de clorose e embranquecimento, seguido de necrose nas folhas, principalmente nas regiões em que a solução etanólica se acumulava, nas bordas e nas nervuras foliares, com posterior murcha.

Brum e colaboradores (2014) obtiveram resultados parecidos, onde as concentrações de 2 e 4% dos óleos essenciais de citronela (*C. nardus*), capimlimão (*C. citratus*), erva-cidreira (*L. alba*) e hortelã-pimenta (*M. piperita*) causaram fitotoxicidade em plântulas de melancia (*C. lanatus*), feijão-carioca (*P. vulgaris*) e arroz (*O. sativa*).



Figura 13 - Ensaio em casa de vegetação em plântulas de feijoeiro comum na presença de extrato etanólico de talo de *Piper tuberculatum* e do fungo *R. solani*. Controles com fungicida, água e etanol.

6 CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos de talos de *P. tuberculatum* foram eficientes no controle *in vitro* de *R. solani* e *S. rolfsii*.

Os extratos etanólicos de talo de *Piper* se apresentaram fitotóxico para as folhas de *P. vulgaris*.

O extrato etanólico de talo da espécie *P. tuberculatum* apresentou citotoxicidade a células de mamíferos (monócitos). Entretanto, o extrato aquoso desta não apresentou citotoxicidade nas concentrações avaliadas.

REFERÊNCIAS

- AIRES, I.C.S.; LIMA, R.A. Potencial fungicida do extrato etanólico dos talos de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Candida albicans* in vitro. **Revista Eletrônica de Biologia**. Rondônia, n3, 2014. Disponível em: <
<http://revistas.pucsp.br/index.php/reb/article/view/17507>>. Acesso em: 13 jan. 2015.
- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, PR, Set. 2006. Disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n3/a16v16n3>>. Acesso em: 23 maio 2006.
- AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, Viçosa, MG, n.12, 2005. Disponível em: <
<https://www.researchgate.net/publication/266445173>>. Acesso em: 26 out. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Brasília: ANVISA, 2013- Anual.
- ARAÚJO-JÚNIOR, J.X., CHAVES, M.C.O., CUNHA, E.V.L., GRAY, A.I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, João Pessoa, PB, n.27, 1999. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197898000830>>. Acesso em: 22 out. 2014.
- ARAÚJO, E.R.; HARAND, W.; LIMA, I.C.; DIAS, F.C.R.; SANTANA, A.A.D.; CARVALHO, R.R.C. E LARANJEIRA, D. Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, n.2, fev. 2014. Disponível em: <
<http://www.scielo.br/pdf/pab/v49n2/0100-204X-pab-49-02-00088.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2015.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Embrapa Arroz. Goiás, GO.
- BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. 2009. IN: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - Superintendência do Estado do Pará – Serviço de pesquisa. Belém do Pará.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de pragas de plantas: uso e

perspectivas. 2009. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; PESSOA, O. D. L.; LIMA, M. A. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. In: Recent Progress in **Medicinal Plants**: Standardization of Herbal/Ayurvedic Formulations; GOVIL, J. N.; SINGH, V. K.; ARUNACHALAM, C., eds.; Studium Press, LLC: Houston, 2008.

BEZERRA, D.P. **Potencial anticâncer da piplartina e da piperina, amidas isoladas de plantas do gênero piper**. 2005. 119p. Dissertação (Farmacologia) - Universidade federal do Ceará faculdade de medicina. Fortaleza, CE, 2005.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: KIMATI, H. et al. Manual de fitopatologia: **Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed., vol. 2, 345p. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

BIGATON, D.; BACCHI, L.M.A.; FORMAGIO, A.S.N.; GAVASSONI, W.L.; ZANELLA, C.S. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, CE, n. 4, dez, 2013. Disponível em: < <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/2346> >. Acesso em: out. 2014

BINOTTI, F. F. S.; ARF, O.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; ALVAREZ, A. C. C.; KAMIMURA, K. M. **Fontes, doses e modo de aplicação de nitrogênio em feijoeiro no sistema plantio direto**, Bragantia, Campinas, n.2, jan. 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/brag/v68n2/22.pdf> >. Acesso em: 22 out. 2014.

BONETT, L.P.; MÜLLER, G.M.; WESSLING, C.R.; GAMELLO, F.P. Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família Asteraceae sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) **Revista Brasileira de Agroecologia**, local, n4, dez.2012. Disponível em: < <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/2346/858> >. Acesso em: 02 out. 2015.

BRUM, R. B. C. S.; CASTRO, H. G.; GAMA, F. R.; CARDON, C.H.; SANTOS, G. R. Phytotoxicity of essential oils in watermelon, bean and rice plants. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, TO, n.2, maio 2014. Disponível em: < <file:///C:/Users/Durval/Downloads/1194-8367-1-PB.pdf> >. Acesso em: 29 set. 2014.

CABRAL, D. **Eficácia de Piper nigrum E Chenopodium ambrosioides no controle do inseto-praga de grãos armazenados Sitophilus zeamais**. 2011. 27p. Monografia (Graduação em Agronomia e medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

CASTRO, M.J.P.; SILVA, P.H.S.; PÁDULA, L.E.M. Atividade de extratos de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, CE, n 3, set. 2008. Disponível em: < <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/2346/858> >. Acesso em: 02 out. 2014.

CAVALHEIRO AJ; FURLAN M. 2000. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, São Paulo, SP, n.2, abr. 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200002260> >. Acesso em: 22 out. 2014.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, n.1, mês. 2008. Disponível em: < <http://eduem.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/1104/617> >. Acesso em: 11 out. 2014.

CHAVES, M.C.O., OLIVEIRA, A.H., SANTOS, B.V.O. 2006. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. n.1, dez. 2006. Acesso em: 25 out. 2014.

COLTURATO, A. B.; FURTADO, E. L. Controle de *Botryosphaeria ribis* causador de seca de ponteiro em *Corymbia citriodora*, com extratos vegetais e fungicidas. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, n. 3, jun. 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/sp/v37n3/a10v37n3.pdf> >. Acesso em: 3 ago. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Brasília: CONAB, 2015- . Mensal.

COSTA, G. R.; CAFÉ FILHO, A. C.; LOBO JUNIOR, M. Controle Químico da Mela do Feijoeiro Comum. 2008. Circular Técnica, 82. Santo Antônio de Goiás, GO.

DIETRICH, F.; STROHSCHOEN, A.A.G.; SCHULTZ, G.; SEBBEN, A.D.; REMPEL, C. Utilização de inseticidas botânicos na agricultura orgânica de arroio do meio/RS. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, n.2-4, jun. 2011. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/viewFile/2056/1893>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**, Boca Raton, CRC Press, 1995, 355p.

DIGNANI, D.F. **Peperomia blanda (Piperaceae): avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante**. 2009. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, 2009.

DINIZ, L.P.; MAFFIA, L.A.; DHINGRA, O.D.; CASALI, V.W.D.; SANTOS, R.H.S.; MIZUBUTI, E.S.G. Avaliação de Produtos Alternativos para Controle da Requeima do Tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, MG, n.2, abr. 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/fb/v31n2/30011.pdf> >. Acesso em: 20 out. 2014.

DUARTE, M. L. R.; FERREIRA, M. G. T.; ALBUQUERQUE, F. A. B.; MORAES, A. J. G. **Redução de perdas de estacas de pimenteira-do-reino causadas por Sclerotium rolfsii no pré-enraizador**. 2006. Embrapa Amazônia Oriental, documentos, 54. Belém, PA.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M. Constituents of Piper aleyreanum (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 13, 113p. 2003.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, n.6, 2008.

FERNANDES, C. F.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, n.3, Porto Velho, RO, jun. 2006. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48993/1/cleberon.pdf> >. Acesso em: 12 ago. 2014.

FERNANDES, C. F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G.; REIS, N. D. ANTUNES JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**, 2009, 18p.

FERNANDES, S.B.; SILVA, C. A.; ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M. A.P. **Quantificação dos teores de proteína e minerais em sementes de feijão comum de diferentes cores**. Embrapa Arroz e Feijão/UFLA, 2012. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/912536/3/gm93.pdf>. Acesso em: 22 de agosto de 2015.

FIALLOS, F.R.G. Modelo de ponto crítico para estimar danos causados pela mela na cultura do feijoeiro. 2011. Nota técnica. Mocache, Los Ríos.

FIGUEREDO, F.G.; TINTINO, S.R.; BRITO, D.I.V.; BRAGA, M.F.B.M.; LEITE, N.F.; LUCENA, B.F.F.; SOUZA, C.E.S.; GOMEZ, M.C.V.; COUTINHO, H.D.M. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 1, Crato, CE, n.2, jul. 2014. Disponível em: < http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/2938/1520 >. Acesso em: 24 ago. 2015.

FONSECA, M.C.M.; LEHNER, M.S.; GONÇALVES, M.G.; PAULA JÚNIOR, T.J.; SILVA, A.F.; BONFIM, F.P.G.; PRADO, A.L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, n.1, maio 2015. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n1/1983-084X-rbpm-17-01-00045.pdf> >. Acesso em: 17 ago. 2015.

GODOY, C.V.; MEYER, M.C. Resistência a fungicidas na cultura da soja – Fitossanidade. 2014 Pág. 05. Disponível em: www.fundacaomeridional.com.br. Acesso em 10 de setembro de 2015.

GODOY, R.C.B.; OLIVEIRA, M.I. **Agrotóxicos no Brasil: processo de registro, riscos à saúde e programas de monitoramento**. 2011. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004. p. 30. Documentos, 134. Cruz das Almas, BA.

GOULART, A.C.P.; ASSIS, J.B.; CIAMPI, M.B.; CERESINI, P.C. Ocorrência de mela causada por *Rhizoctonia solani* AG4-HGI em plântulas de algodoeiro no Brasil. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, n. 1, jan. 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/sp/v37n1/v37n1a12.pdf> >. Acesso em: 29 nov. 2014.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I. Rodriguésia, CE, v. 55, 46p. 2004.

GUIMARÃES, E.F.; CARVALHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E.S.; QUEIROZ, G.A. Piperaceae in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12735>>. Acesso em: 20 de agosto de 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Brasília: IBGE. 2015 – Mensal.

JARAMILLO, M.S.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, North Carolina, n.1, jun.

2001. Disponível em: < file:///C:/Users/Durval/Desktop/jaramillo,%202001.pdf >. Acesso em: 15 set. 2015.

JUNIOR BORELLA, MARTINAZZO, E.G.; AUMONDE, T.Z.; AMARANTE, L. D; MORAES, D.M.; VILLELA, F. A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Brasilica**, Pelotas, RS, n.2, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v26n2/17.pdf> >. Acesso em: 24 jan. 2014.

KIM, S.I.; ROH, J.Y; KIM, D.H.; LEE, H.S.; AHN, Y.J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, Botucatu, n.4, jul. 2003. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13n4/a16v13n4.pdf> >. Acesso em: 21 out. 2015.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia: **doenças de plantas**. 4. Ed. Piracicaba: Ceres, 2005. 663p.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.

LOPES, P. R. S.; RADUNZ NETO, J.; MALLMANN, C. A.; LAZZAR, R.; PEDRON, F. DE A.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Santa Maria, RS, n. 10, out. 2005. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/pab/v40n10/a12v4010.pdf> >. Acesso em: 12 out. 2014.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; REZENDE JÚNIOR, M. F. R. Tombamento de mudas de espécies florestais causado por *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, n. 4, mar. 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v31n4/07.pdf> >. Acesso em: 21 dez. 2014.

MAGALDI, S.; GIRÓN, M. E.; AGUILAR, I.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Antifungal activity of *Crotalaria durissus cumanensis* venom. **Mycoses**, Caracas, Venezuela n.45, maio 2002.

MAIA, T.F.; DONATO, A.; FRAGA, M.E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, n.1, dez. 2015. Disponível em: < <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev171/Art17111.pdf> >. Acesso em: nov. 2015.

MATIOLLI, L. S. **Avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante de plantas condimentares**. 2014. 44p. Dissertação (Mestrado em biociências) - Universidade Estadual Paulista, Assis, SP, 2014.

MEDEIROS, E.V.; VIANA, M.G.; ALBUQUERQUE, C.C.; VIANA, F.A.; SILVA, K.M.B. Extrato etanólico de *Senna alata* no controle de *Fusarium oxysporum*, causador da murcha-de-fusarium do meloeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n.11, ago. 2012. Disponível em: <
<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v16n11/v16n11a04.pdf> >. Acesso em: 26 jan. 2014.

MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R.H.P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta bot. Bras**, 2, out. 2004. Disponível em: <
<http://www.scielo.br/pdf/abb/v18n2/v18n02a19.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2014.

MEGURO, M.; BONOMI, M.V. Ação inibitória do extrato de rizoma de *Cyperus rotundus* L. no desenvolvimento de alguns fungos. Departamento de Botânica da Faculdade de Filosofia. Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. 1969.

MENEZES, E.L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p.

MICHEREFF, S.J. Fundamentos de Fitopatologia. Universidade federal rural de Pernambuco departamento de agronomia área de fitossanidade, 2001. Recife, PE.

MIRANDA JE; OLIVEIRA JE de M.; ROCHA KCG; BORTOLI SA; NAVICKIENE HMD; KATO MJ; FURLAN M. 2002. Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, n.2, ago. 2002. Disponível em: <
https://www.researchgate.net/publication/236163443_Potencial_inseticida_do_extrato_de_Piper_tuberculatum_Piperaceae_sobre_Alabama_argillacea_Huebner_1818_Lepidoptera_Noctuidae >. Acesso em: 20 set. 2013.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C; LOPES, P.O.M.V., NAKANO, E; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; KAWANO, T. Avaliação da atividade esquistossomocida da amida piplartina. **Revista Saúde**, 4, (S/M). 2010. Disponível em: <
<file:///C:/Users/Durval/Downloads/689-2477-1-PB.pdf> >. Acesso em: 11 ago. 2015.

MORALES, A.; ROJASA, J.; MOUJIRB, L. M.; ARAUJO, L.; RONDÓN, M. Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activities of *Piper hispidum* Sw. essential oil collected in Venezuela. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, local, n.06, Jun. 2013. Disponível em: <

http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/916_pdf.pdf >. Acesso em: 28 out. 2015.

MOREIRA, R.C.T.; COSTA, L.C.B.; COSTA, R.C.S.; ROCHA, E.A. Abordagem Etnobotânica acerca do Uso de Plantas Medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farm. Bonaerense**, Ilhéus, BA, n.3, jun. 2002. Disponível em: <http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/3/LAJOP_21_3_3_1_L8H8YN8M78.pdf >. Acesso em: 10 out. 2015.

NAVICKIENE, H. M.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D.; YOUNG, M. C.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, n.6, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130674>>. Acesso em: 24 out. 2015.

NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Boa Vista, RR, n.5, out. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v31n5/11.pdf> >. Acesso em: 12 jan. 2104.

OLIVEIRA, G.L.; CARDOSO, S.K.; LARA JÚNIOR, C. R.; VIEIRA, T.M.; GUIMARÃES, E.F.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). In: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, local, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652013000401227 >. Acesso em: 20 mar. 2014.

OLIVEIRA, P.D.L. **Aplicação combinada de quitosana e óleo essencial de mentha piperita L. no controle de fungos patógenos pós-colheita**. 2014. 52p. Monografia (Graduação em nutrição) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2014.

ORLANDELLI, R.C.; ALBERTO, R.N.; KWIATKOWSKI, A.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J. A. Ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* Sw. contra *Micrococcus luteus*. In: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar CESUMAR. **Anais Eletrônico VII EPCC**, Maringá, PR 2011. Disponível em: <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/raiani_nascimento_alberto_2.pdf >. Acesso em: 26 fev. 2015.

PANG, Y-P.; BRIMIJOIN, S.; RAGSDALE, D. W.; ZHU, K. Y.; SURANYI, R. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. **Current Drug Targets**, n.4, abr. 2012. Disponível

em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3343382/> >. Acesso em: 15 out. 2014.

PELAEZ, V.; MELO, M.; HOFMANN, R.; HAMERSCHMIDT, P.; MEDEIROS, G.; MATSUSHITA, A.; TEODOROVICZ, T.; MOREIRA, F.; WELINSKI, J.; HERMIDA, C. Monitoramento do mercado de agrotóxicos. Departamento de Economia, UFPR, 2010.

PIGNATI W, MACIEL RHMO, RIGOTTO RM. Saúde do trabalhador. In: Rouquayrol MZ. Epidemiologia & Saúde. 7ª ed. Rio de Janeiro: MedBook; 2013. 381p.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 14 ed. Piracicaba: Degaspari 2000. 477p.

PITON, L.P.; TURCHEN, L.M.; BUTNARIU, A.R.; PEREIRA, M.J.B. Natural insecticide based-leaves extract of *Piper aduncum* (Piperaceae) in the control of stink bug brown soybean. **Ciência Rural**, Santa Maria, n.11, nov, 2014. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v44n11/0103-8478-cr-44-11-01915.pdf> >. Acesso em: 09 fev. 2015.

PRETTY, J.; GUIJT, I.; SCOONES, I.; THOMPSON, J. Regenerating Agroecology of low-external input and community-based development. In: KIRKBY, John; O'KEEFE, Phil; TIMBERLAKE, Lloyd (Eds.). **The earthscan reader in sustainable development**. UK, 1999. 132p.

POSSE, S. C. P.; RIVA-SOUZA, E. M.; SILVA, G. M.; FASOLO, L. M.; SILVA, M. B.; ROCHA, M. A. M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum na região central-brasileira: 2009-2011**. 2010. Vitória, ES

PONTES, A. S.; SETÚBAL, S. S.; XAVIER, C. V.; SILVA, F. L.; KAYANO, A. M.; PIRES, W. L.; NERY, N. M.; CASTRO, O. B.; SILVA, S. D.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P.; Effect of L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophils. **Toxicon**, (SL), mar. 2014.

RAMALLO, I. A.; SALAZAR, M. O.; MENDEZ, L.; FURLAN, R. L. E. Chemically engineered extracts: Source of bioactive compounds. **Accounts of Chemical Research**, Rosario, n.4, fev. 2011. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ar100106n> >. Acesso em: 30 mar. 2015.

RIBEIRO, N. D.; SOUZA, J. F.; ANTUNES, I. F.; POERSCH, N. L. Estabilidade de produção de cultivares de feijão de diferentes grupos comerciais no estado do rio

grande do sul. **Bragantia**, Campinas, n.2, Fev. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v68n2/07.pdf>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

ROGDRIGUES, V. M.; VALENTE, E. C. N.; LIMA, H. M. A.; TRINDADE, R. C. Pr.; DUARTE, A. G. Avaliação de extratos de *Annona muricata* L. sobre *Aphis craccivora* Koch, 1854 (Hemiptera: Aphididae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, n.3, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/15369/10663>>. Acesso em: 18 abr. 2015.

SAN, T. M.; VEJAYAN, J.; SHANMUGAN, K.; IBRAHIM, H. Screening antimicrobial activity of venoms from snakes commonly found in Malaysia. **Journal of Applied Sciences**, n.19, (S/M). 2010. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/20103273156.html;jsessionid=7997DCB837F6E1BE04635784BDF1D637?freeview=true>>. Acesso em: 21 out. 2014.

SANTANA, H.T. **Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: culicidae) em condições de campo simulado**. 2012. 90p. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, 2012.

SANTOS, A. A.; PINHEIRO NETO, L.G. **Podridão-de-Esclerócio do Melão no Estado do Ceará**. Comunicado Técnico. 2004. Fortaleza, CE.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; FERNANDES, C. F.; SILVA, A. G.; FACUNDO, V. A. Atividade fungicida do óleo essencial de *Piper marginatum* L. (Piperaceae) sobre *Fusarium oxysporum* (Schlecht) in vitro. **Revista Saúde e Pesquisa**, n.1, 2011. Disponível em: <<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/1700/1194>>. Acesso em: 23 ago. 2014.

SANTOS, M.R.A.; SILVA, A.G.; LIMA, R.A.; LIMA, D.K.S.; SALLET, L.A.P.; TEIXEIRA, C.A.D.; POLLI, A.R.; FACUNDO, V.A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasil. Bot.**, n.2, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v33n2/a12v33n2.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2014.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Documentos, 50. 1994. Brasília: EMBRAPA-SPI

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. **Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal**. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.;

STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. 248p.

SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no estado do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, São Luis, MA, n.1, out. 2005. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/fb/v30n1/a10v30n1.pdf> >. Acesso em: 12 set. 2014.

SHANER, G.; FINNEY, R. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox Wheat. **Journal of Phytopathology**, West Lafayette, n.8, fev. 1977. Disponível em: < https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n08_1051.PDF >. Acesso em: 12 ago. 2014.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipella perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Marituba, PA, n.2, abr. 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/fb/v32n2/08.pdf> >. Acesso em: 23 set. 2014.

SILVA, D. J. B.; JORGE, L. A. C. AFSoft – Software para análise foliar. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 17., São Carlos, novembro, 2009. **Anais eletrônicos...** Local, SIIC USP, 2009. Disponível em: <http://www.usp.br/siicusp/resumos/17Siicusp/resumos/6027.Pdf>. Acesso em 10 de outubro de 2015.

SILVA, R.V., NAVICKIENE, H.M.D., KATO, M.J., BOLZANI, V.S., MÉDA, C.I., YOUNG, M.C.M., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, Oxford: Pergamon-Elsevier B.V., n.5, 2002. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/11449/40013> >. Acesso em: 11 ago. 2002.

SOUZA, A. P. **Atividade inseticida e modo de extração de Meliáceas sobre Bemista tabaci (GENN, 1889) biótipo B**. 2004. 101p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.

SOUSA, P.J.C.; BARROS, C.A.L.; ROCHA, J.C.S.; LIRA, D.S.; MONTEIRO, G.M.; MAIA, J.G.S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Belém, PA, n.2, Jun. 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n2/13.pdf> >. Acesso em: 14 ago. 2015.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Areia, PB, n.6, dez.

2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/fb/v32n6/a03v32n6.pdf> >. Acesso em: 21 dez. 2014.

SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta bot. bras.**, Goiás, GO, n.1, jul. 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abb/v20n1/13.pdf> >. Acesso em: 24 set. 2104.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: **Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2005. Plantarum, Nova Odessa.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Metabólitos secundários e defesa vegetal**. In: Fisiologia vegetal. 4ª edição, 820p. 2009.

TEBBS, M.C. Revision of Piper (Piperaceae) in the New World 1. **Review of characters and taxonomy of Piper section Macrostachys**. Bulletin of the British Museum Natural History. 1989.

TEBBS, M.C. Piperaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G. e BITTRICH, V. (eds). **Flowering plants; Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families**. 1993. Springer Verlag, Berlin.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. Controle de doenças de plantas: grandes culturas. v.1. Viçosa MG, 1997. 553p.

VEGRO, C. L. R.; FERREIRA, C. R. R. P. T. **Evolução das despesas com defensivos agrícolas e fertilizantes para a safra de café 200/01 nos estados de São Paulo e Paraná**. Informações Econômicas. 2000. Porto Velho, RO.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L.A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, **Brasil. Acta bot. bras.**, n.2, 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abb/v20n2/a12v20n2.pdf> >. Acesso em: 1 out. 2015.

VIEIRA JUNIOR, J. R. **Procariotas residentes do filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. 2005. 146p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; SILVA, D. S. G.; RAMALHO, A. R.; MARCOLAN, A. L.; ANTUNES JÚNIOR, H.; DIOCLECIANO, J. M. REIS, N. D.

Avaliação de acessos e cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) quanto à resistência a mela (*Thanatephorus cucumeris* L.). 2009. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 64. Porto Velho, RO.

VIEIRA JÚNIOR, J.R.; FERNANDES, C.F. Mela do feijoeiro: ameaça às lavouras de feijão rondonienses. 2011. Artigos técnicos. Porto Velho, RO.

VIEIRA JÚNIOR, J.R.; FERNANDES, C.F.; ROSA NETO, C.; DIOCLECIANO, J.M.; MARCOLAN, A.L.; FERRO, G.O.; ANTUNES JÚNIOR, H.; REIS, N.D.; SILVA, D.S.G. **Ocorrência da mela (*Thanatephorus cucumeris*) em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. em Rondônia.** 2010. Comunicado técnico. Porto Velho, RO.

VIEIRA JUNIOR, J. R.; MINOSSO, S. C. C.; FERNANDES, C. F.; SILVA, D. S. G.; ALMEIDA, U. O.; SANTANA, L. S.; SILVA, C. M.; RODRIGUES, M. M.; ANTUNES JÚNIOR, H.; NOGUEIRA, A. E.; MATOS, S.I. Efeito de extratos de plantas no controle da mela do feijoeiro (*Rhizoctonia solani*) em campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XLIV., 2011. Bento Gonçalves. **Anais eletrônicos...** Rio Grande do Sul: CBF, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672008000400018>. Acesso em: 26 fev. 2015.

XIE, H.; YAN, M.C.; JIN, D.; YU, M.; DONG, D.; CAI, C. C.; PAN, S. L. Studies on antidepressant and antinociceptive effects of ethyl acetate extract from *Piper laetispicum* and structure-activity relationship of its amide alkaloids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 2011.

YOUSSEF, D.R.; SOUZA, G.R.; NECHE, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* associados à queima foliar em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, Boa Vista, RR, n. 2, ago.2012. Disponível em: <<http://revista.ufrb.br/index.php/agroambiente/article/view/872/784> >. Acesso em: 7 nov. 2014.

ZACARONI, L.M.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; PIMENTEL, F.A.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, n.1), mês. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v39n1/a20v39n1.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2013.

ZILIO, M.; COELHO, C. M. M.; SOUZA, C. A.; SANTOS, J. C. P.; MIQUELLUTI, D. J. Contribuição dos componentes de rendimento na produtividade de genótipos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, CE, n. 2, jun. 2011.